

# **DIFFERENTIELLE EXPRESSION DES TYROSIN-KINOMS BEI AKUTER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE DES ERWACHSENEN ALTERS**

**D I S S E R T A T I O N**

zur Erlangung des akademischen Grades

**DOCTOR RERUM NATURALIUM**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Anna-Juliane Schmachtenberg

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter:

1. Prof. Dr. Kai Matuschewski
2. PD Dr. Dr. Thomas Burmeister
3. Prof. Dr. Michael Hummel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2017



# Zusammenfassung

Tyrosinkinasen (TK) sind Enzyme der Signaltransduktion, welche durch Tyrosin-Phosphorylierung ihrer Zielproteine deren Aktivitätszustand verändern. Tyrosinkinasen lassen sich in zwei Klassen aufteilen, die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und zytoplasmatischen Tyrosinkinasen („*Non-Receptor*“ Tyrosinkinasen, NRTK). Rezeptor-Tyrosinkinasen bilden eine Superfamilie von Zellmembran-Proteinen, welche als Rezeptoren von Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone, Signale in das Innere der Zelle weiterleiten. NRTK sind Teil zellulärer Signalkaskaden und werden ebenfalls durch Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert. Sowohl RTK als auch NRTK sind Schlüsselregulatoren normaler zellulärer Prozesse und beeinflussen Zellzyklus, Zellüberleben, Apoptose, Proliferation und Differenzierung. Eine Dysregulation ihrer Aktivität trägt zur Entstehung von Leukämien und anderen malignen Erkrankungen bei. Beispielsweise weisen 30 % der akuten myeloischen Leukämien aktivierende Mutationen in der RTK FLT3 auf und 95 % der chronischen myeloischen Leukämien sowie 25 % der adulten akuten lymphatischen Leukämien eine über Translokation konstitutiv aktivierte NRTK ABL1.

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) des erwachsenen Alters führt unbehandelt rasch zum Tode. Trotz intensiver und nebenwirkungsreicher Therapie beträgt das 5-Jahres-Gesamtüberleben von erwachsenen Patienten mit ALL zurzeit nur etwas über 50 %. Im Gegensatz zu konventionellen Chemotherapeutika ermöglicht der Einsatz von spezifisch wirkenden Tyrosinkinase-Inhibitoren einen individualisierten Therapieansatz mit positivem Effekt auf das Nebenwirkungsprofil und Remissionsraten.

Um mögliche neue therapeutische Ziele zu identifizieren, wurde im Rahmen dieser Promotion eine systematische Erhebung der Expressionsveränderungen des gesamten Tyrosin-Kinoms vorgenommen. Eine Vielzahl verschiedener Tyrosinkinasen zeigten starke Abweichungen vom Expressionsprofil gesunder hämatopoetischer Zellen. Ein Teil dieser Expressionsveränderungen ließ sich auf ein verändertes Methylierungsprofil in der adulten ALL zurückführen. Als potentielle Marker konnten die Gene EPHA7 und PTK2 für B-Linien ALL und die Gene NTRK3, ERBB4 und ZAP70 für T-Linien ALL identifiziert werden. Die interindividuell differente Expression der Tyrosinkinasen EPHA3, EPHB3, KIT, ZAP70 und PDGFRB ermöglicht mutmaßlich eine exaktere Risikoklassifizierung. Insbesondere die Tyrosinkinasen ABL1, DDR1, EPHA7, FGFR1, ERBB4, FLT1, FLT3, FLT4, LCK, LTK, PTK2, PTK2B, PTK7, SRC, TEC und TYK2 stellen vielversprechende therapeutischen Ansatzpunkte dar, deren Proliferations-fördernde und/oder Apoptose-inhibierende Eigenschaften im hämatopoetischen System bereits in anderen Studien nachgewiesen wurde. Der stark überexprimierten RTK FLT4 konnte erstmals eine proliferationsfördernde Wirkung auf leukämische Zellen nachgewiesen werden, welche durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib wieder aufgehoben wurde.

## Summary

Tyrosine kinases (TK) are signal transduction proteins that alter the activity of their target proteins by tyrosine phosphorylation. Tyrosine kinases can be divided into two classes, receptor tyrosine kinases (RTK) and cytoplasmic non-receptor tyrosine kinases (NRTK). Receptor tyrosine kinases are a superfamily of cell membrane proteins, which bind growth factors, cytokines or hormones for signal transduction. NRTK are part of cellular pathways. RTK and NRTK are key regulators of cellular processes and influence cell cycle, cell survival, apoptosis, proliferation and differentiation. Dysregulation of their activity contributes to the development of leukemia and other malignancies. E.g. 30% of acute myeloid leukemias have activating mutations in RTK FLT3 and 95% of chronic myeloid leukemias and 25% of adult acute lymphoblastic leukemias have a constitutive activated NRTK ABL1.

The 5-year overall survival of acute lymphoblastic leukemia (ALL) remains despite intensive and side-effect-rich therapy around 50 %. In contrast to conventional chemotherapeutic agents, the use of specific tyrosine kinase inhibitors enables an individualized therapeutic approach with positive effect on the side-effect profile and remission rates. In order to identify possible new therapeutic targets, a systematic survey of the expression changes of the entire tyrosine kinome was carried out. A variety of different tyrosine kinases showed in ALL-cells great differences to the expression profile of healthy hematopoietic cells. Some of these expression changes can be attributed to a changed methylation profile in adult ALL. As potential markers could be identified the genes EPHA7 and PTK2 for B-lymphoblastic ALL and NTRK3, ERBB4 and ZAP70 for T-lymphoblastic ALL. The interindividually different expression of the tyrosine kinases EPHA3, EPHB3, KIT, ZAP70 and PDGFRB presumably allows a more precise risk classification. In particular, the tyrosine kinases ABL1, DDR1, EPHA7, FGFR1, ERBB4, FLT1, FLT3, FLT4, LCK, LTK, PTK2, PTK2B, PTK7, SRC, TEC and TYK2 are promising therapeutic targets. Their proliferation-promoting and / or apoptosis-inhibiting properties in hematopoietic systems are known. The proliferation-promoting effect of the overexpressed RTK FLT4 on leukemic cells could be demonstrated for the first time.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Das hämatopoetische System	1
1.1.1	Hämatopoese	1
1.1.2	Funktionen der Lymphozyten	3
1.2	Leukämogenese	3
1.3	Akute Leukämien	5
1.3.1	Akute lymphatische Leukämie	6
1.3.2	Therapie und Prognose der akuten lymphatischen Leukämien	11
1.4	Tyrosinkinasen	12
1.4.1	Rezeptor-Tyrosinkinasen	12
1.4.2	Zytoplasmatische Tyrosinkinasen	16
1.4.3	Tyrosinkinase-Familien mit elementaren Funktionen in der Hämatopoese und Leukämogenese	17
1.4.4	Bedeutung von Tyrosinkinasen als Medikamentenziele bei malignen Erkrankungen	19
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
3.1	Expressionsanalyse von Tyrosinkinase-Genen	25
3.1.1	<i>TaqMan® Array Card</i> Expressionsanalyse	25
3.1.2	Patientenproben	26
3.1.3	Kontrollproben, aufgereinigte B-, T-lymphatische Zellen und Stammzellen	27
3.1.4	Expressionsanalyse des Tyrosin-Kinoms von ALL-Patienten	28
3.1.5	Tyrosinkinase-Expression gesunder Lymphozyten	32
3.1.6	Tyrosinkinase-Expression akuter B- und T-lymphatischer Leukämien	32
3.1.7	Tyrosinkinase-Expression akuter B-lymphatischer Leukämien	36
3.1.8	Tyrosinkinase-Expression akuter T-lymphatischer Leukämien	41
3.1.9	Tyrosinkinase-Expression gesunder Stamm-, T- und B-lymphatischer Zellen	45
3.1.10	Clusteranalyse	47
3.2	Methylierungsanalyse	53
3.3	Wachstumsanalysen	58
3.3.1	FLT4 Wachstumsanalyse	58
3.3.2	ERBB4 Wachstumsanalyse	61
3.3.3	EPHA7 Wachstumsanalyse	64
3.4	Sequenzanalyse	69
3.4.1	Sequenzpolymorphismen der Tyrosinkinasen	69

3.4.2	Spleißvarianten.....	74
3.4.3	Translokationen .....	77
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>81</b>
4.1	Expressionsanalyse .....	81
4.2	Expressionsanalyse des Tyrosin-Kinoms von Stammzellen, B-lymphatischen und T-lymphatischen Zellen .....	83
4.3	Clusteranalyse .....	83
4.4	Expressionsanalyse des Tyrosin-Kinoms adulter ALL-Patienten.....	84
4.4.1	Tyrosinkinassen mit hoher Expression in B- und T-Linien ALL .....	88
4.4.2	Tyrosinkinassen mit hoher Expression in B-Linien ALL .....	95
4.4.3	Tyrosinkinassen mit hoher Expression in T-Linien ALL.....	101
4.4.4	Tyrosinkinassen mit verringerter Expression in B- und T-Linien ALL .....	105
4.4.5	Tyrosinkinassen als prognostische Marker .....	106
4.5	Methylierungsanalyse .....	109
4.6	Wachstumsanalysen.....	111
4.7	Sequenzanalysen .....	112
4.7.1	Sequenzpolymorphismen der Tyrosinkinassen.....	112
4.7.2	Spleißvarianten.....	113
4.7.3	Translokationen .....	115
4.8	Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Behandlung akuter lymphatischer Leukämien .....	116
4.9	Zusammenfassung .....	118
<b>5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL und METHODEN.....</b>	<b>127</b>
6.1	DNA- und RNA-Techniken .....	127
6.1.1	Aufreinigung von DNA .....	127
6.1.2	RNA-Isolierung .....	128
6.1.3	DNA- und RNA-Quantifizierung .....	128
6.1.4	DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	128
6.1.5	Long-Range PCR .....	132
6.1.6	Elektrophorese von DNA-Fragmenten .....	132
6.1.7	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	133
6.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	134
6.1.9	Ligation.....	134
6.1.10	Langstrecken-inverse (LDI) PCR .....	135
6.1.11	Reverse Transkription - cDNA Synthese.....	137
6.1.12	Quantitative PCR.....	138
6.1.13	Expressionsanalyse mittels <i>TaqMan</i> ® Array Card .....	140
6.1.14	Methylierungsanalyse mittels <i>EpiTect</i> ® Methyl qPCR Array .....	144

6.1.15	5' - <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> .....	145
6.1.16	<i>High Resolution Melt</i> (HRM) Analyse.....	146
6.1.17	Bestimmung der Kopienanzahl im Genom.....	147
6.1.18	Gerichtete Klonierung in Expressionsvektoren.....	148
6.1.19	Bakterienstämme und Kulturbedingungen .....	148
6.1.20	Transformation rekombinanter DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Bakterien.....	149
6.1.21	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	149
6.1.22	Kryokonservierung von Bakterien .....	150
6.1.23	DNA-Sequenzierung.....	150
6.1.24	Verwendete Vektoren .....	150
6.2	Protein-Techniken.....	151
6.2.1	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE.....	151
6.2.2	Western Blot.....	152
6.2.3	Antikörpernachweis .....	153
6.2.4	Stripping der Western Blot Membran .....	155
6.2.5	Proteinquantifizierung nach Bradford.....	155
6.3	Zellkultur-Techniken .....	155
6.3.1	Kultivierung von Säugerzellen .....	155
6.3.2	Kryokonservierung von Säugerzellen .....	157
6.3.3	Auftauen von Säugerzellen.....	157
6.3.4	Herstellung von Zelllysaten.....	157
6.3.5	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Amaxa .....	158
6.3.6	Stabil transfizierte Zelllinien .....	159
6.3.7	Lymphozytenisolierung über Dichtegradientenzentrifugation .....	159
6.3.8	Magnetisch aktivierte Zellsortierung von CD34+, CD3+, CD19+ Leukozyten	160
6.3.9	Durchflusszytometrie (FACS) .....	160
6.3.10	Zellviabilitätsanalyse mittels WST-1-Reagenz .....	161
6.4	Mathematische Methoden und Software.....	162
6.4.1	DDCt-Methode.....	162
6.4.2	HCL-Tree Multi Experiment Viewer.....	163
6.4.3	Software .....	164
<b>7</b>	<b>GERÄTE und CHEMIKALIEN .....</b>	<b>165</b>
7.1	Geräte .....	165
7.2	Chemikalien.....	166
7.3	Verbrauchsmaterialien .....	167
<b>8</b>	<b>VERZEICHNISSE .....</b>	<b>169</b>
8.1	Literaturverzeichnis.....	169

8.1.1	Internetquellen .....	191
8.2	Abkürzungsverzeichnis .....	195
8.2.1	Maßzahlen .....	195
8.2.2	Abkürzungen .....	195
8.2.3	Namen der Tyrosinkinase .....	199
8.3	Abbildungsverzeichnis .....	201
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>204</b>
9.1	Ergebnisse der Expressionsanalyse des Tyrosin-Kinoms A-Z .....	204

# 1 EINLEITUNG

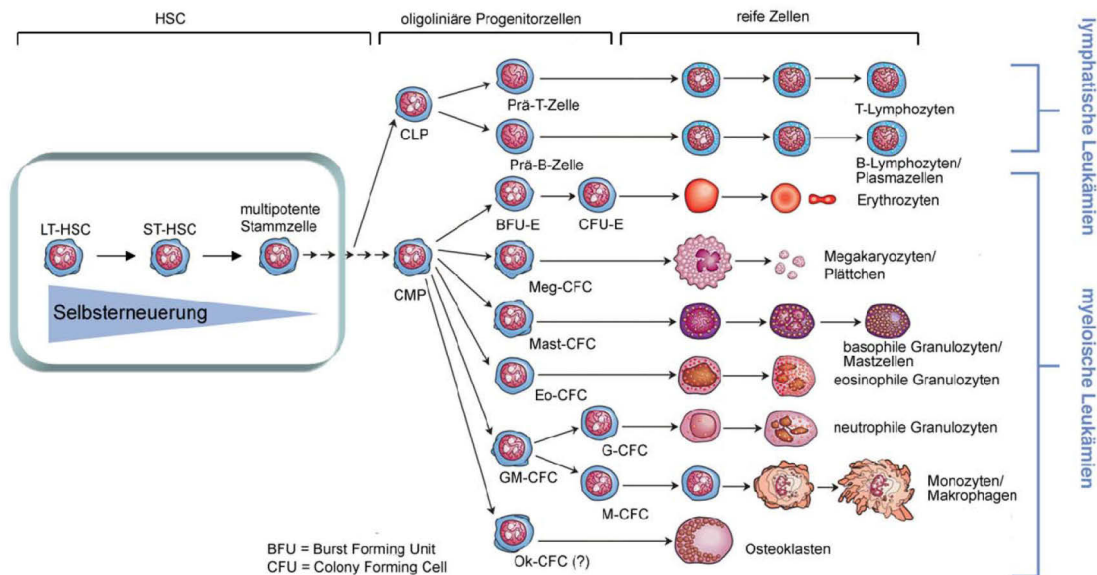
## 1.1 Das hämatopoetische System

### 1.1.1 Hämatopoese

Hämatopoese bezeichnet die Entwicklung blutbildender Zellen aus wenigen pluripotenten Vorläuferzellen, den sogenannten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*: HSCs) und den weiter differenzierten Progenitorzellen. Das hämatopoetische System stellt eine Hierarchie klonogener Zelltypen dar, welche sich in ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung unterscheiden (Szilvassy, 2003). Die unreifen hämatopoetischen Stammzellen stehen an der Spitze dieses hierarchischen Systems und erhalten die Blutzellproduktion aufrecht (Morrison et al., 1997). HSCs stellen eine sehr kleine Zellpopulation dar. Sie treten nur langsam in den Zellzyklus ein und ruhen überwiegend in der G<sub>0</sub>-Phase (Quieszenz). Sie besitzen sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung als auch zur Differenzierung in alle hämatopoetischen Zelllinien (Pluripotenz) (Fuchs and Segre, 2000; Weissman, 2000). Während HSCs mit zunehmendem Reifegrad die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verlieren, steigt im Gegenzug die Proliferationsrate der entstehenden Progenitorzellen stark an. Die multipotenten Vorläuferzellen (MPP) haben als direkte Nachfolger der HSCs, die Fähigkeit zur multilineären Differenzierung und können sich zu beiden oligolineären Progenitorzellen entwickeln: den lymphatischen Progenitorzellen (*common lymphoid progenitors*: CLPs), die sich weiter zu T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen entwickeln und den myeloischen Progenitorzellen (*common myeloid progenitors*: CMPs), welche in die myeloischen/erythrozytären Linien differenzieren (siehe Abbildung 1-1) (Kondo et al., 1997).

Die Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen sowie die Funktion der reifen Blutzellen werden durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren aus der Gruppe der Zytokine reguliert. Zu den bekanntesten darunter zählen beispielsweise die Zytokine Stammzellsfaktor (*stem cell factor*: SCF), *fms related tyrosine kinase 3 ligand* (FL), Thrombopoetin (TPO), Interleukin 3 und 6 (IL3 und IL6), Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren (*colony-stimulating factor*: CSF), Erythropoetin (EPO) und Tumornekrosefaktoren (TNF) (Reya et al., 2001).

Im Laufe der Differenzierung verändert sich das Antigenprofil der hämatopoetischen Zellen. Dies ermöglicht über die Bestimmung von Oberflächenantigenen (*cluster of differentiation*: CD) die Zuordnung der Zellen zum entsprechendem Reifegrad. Typische Oberflächenmarker hämatopoetischer Stammzellen sind u.a. die Oberflächenantigene CD34, CD59 und CD90, welche bei reifen Blutzellen fehlen (Passegué et al., 2003).



**Abbildung 1-1: Klassisches Modell der Hämatopoese**

Das Selbsterneuerungs- und Proliferationspotenzial der hämatopoetischen Stammzellen unterscheidet sich je nach Subtyp (*long term* LT-HSC; *short term* ST-HSC und multipotente HSC). Aus ihnen entstehen oligopotente Progenitorzellen, die in beide Hauptlinien weiter differenzieren: die myeloische Linie (CMPs) und die lymphatische Linie (CLPs). Über verschiedene Zwischenstufen entstehen die reifen Blutzellen. Die lymphoiden B- und T-Zellen bilden den Grundpfeiler des adaptiven Immunsystems. Megakaryozyten bilden Blutplättchen, Erythrozyten transportieren Sauerstoff, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten sind phagozytische Zellen. Abbildung modifiziert nach [1].

Das Knochenmark (KM) ist beim erwachsenen Menschen der wichtigste Ort der Hämatopoese. Die HSCs sind in der Knochenmark-Mikroumgebung der sogenannten Stammzellnische lokalisiert, die sich aus Stroma- und Endothelzellen, Osteoblasten und Adipozyten sowie einer spezifischen extrazellulären Matrix zusammensetzt. Die Stammzellnische beeinflusst die Selbsterneuerung, Differenzierung, Quieszenz, Proliferation und Apoptose der Stamm- und Progenitorzellen und ist für die Aufrechterhaltung eines stabilen HSC-Pools essentiell (Scadden, 2007).

Nach ihrer Ausreifung passieren die Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) die Wände der Blutgefäße, auch Knochenmarksinus genannt, und treten in das periphere Blut über um ihre spezifischen Funktionen zu übernehmen.

**Tabelle 1-1: Oberflächenmarker**

Zelltyp	Oberflächenantigene
Langzeit hämatopoetische Stammzellen (LT-HSCs)	CD34 <sup>+</sup> , CD59, CD90, Lin <sup>-</sup>
Kurzzeit hämatopoetische Stammzellen (ST-HSCs)	CD34 <sup>+</sup> , CD38 <sup>+</sup> , CD59, CD90, Lin <sup>-</sup>
multipotente Vorläuferzellen (MPPs)	CD34 <sup>+</sup> , CD135 <sup>+</sup> , CD224 <sup>+</sup>
myeloische Progenitorzellen (CMP)	CD135 <sup>+</sup> , CD45RA <sup>+</sup> , CD10 <sup>-</sup> , CD7 <sup>-</sup>
lymphatische Progenitorzellen (CLP)	CD34 <sup>+</sup> , CD10 <sup>+</sup> , CD45RA <sup>+</sup> , CD7 <sup>-</sup> , CD3 <sup>+</sup> , CD19 <sup>-</sup>
natürliche Killerzellen (NK)	CD3 <sup>-</sup> , CD16 <sup>+</sup> , CD56 <sup>+</sup>
myeloische Zellen	CD13 <sup>+</sup> , CD33 <sup>+</sup>
B-lymphatische Zellen	CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup>
T-lymphatische Zellen	CD3 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup>

### 1.1.2 Funktionen der Lymphozyten

Reife B-Lymphozyten sind als Antikörperproduzenten ein zentraler Teil der spezifischen Immunabwehr. Die Reifung der B-Lymphozyten erfolgt überwiegend im Knochenmark und in den Lymphknoten. B-Zellen wirken einerseits über die Antikörper-Produktion als Effektorzelle bei der Eliminierung von Antigenen und andererseits als antigenpräsentierende Zelle. B-Lymphozyten exprimieren membranständige Immunglobuline, die B-Zell-Rezeptoren, welche extrazelluläre Antigene erkennen und binden. Nach Kontakt mit einem Antigen differenziert der B-Lymphozyt mit Unterstützung einer aktivierten T-Helferzelle zur antikörperproduzierenden Plasmazelle. Bei der Differenzierung entstehen zu einem kleinen Anteil auch B-Gedächtniszellen, welche bei erneutem Antigenkontakt eine deutlich schnellere Immunantwort ermöglichen.

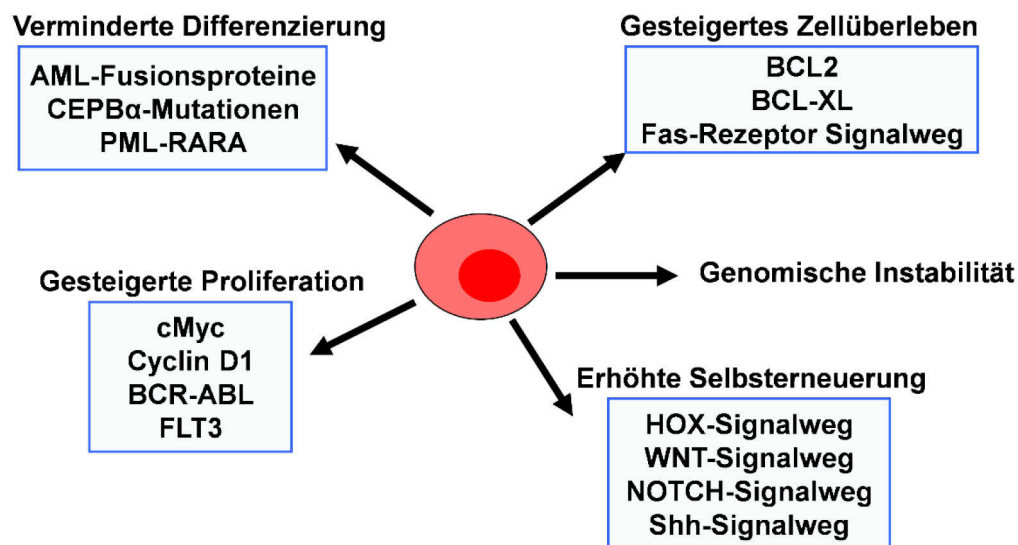
Die funktionelle Differenzierung der T-Lymphozyten erfolgt im Thymus. Durch Rekombination von Gensegmenten der T-Zell-Rezeptor  $\alpha/\beta$ - oder  $\gamma/\delta$ -Genloci können Milliarden verschiedener Rezeptorstrukturen generiert werden. Der T-Zell-Rezeptor erkennt Peptide als Antigene, wie beispielsweise Virusproteine einer infizierten Zelle oder Oberflächenpeptide bakterieller Zellmembranen, welche von antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden. T-Lymphozyten stellen etwa 70 %, B-Lymphozyten ca. 20 % und natürliche Killerzellen etwa 10 % der lymphozytären Zellen dar (Bisset et al., 2004).

## 1.2 Leukämogenese

Die Leukämie als eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems wurde 1845 erstmals von Rudolf Virchow beschrieben, der auch den Begriff der Leukämie prägte (griechisch: *leukós*: weiß und *haima*: Blut). Unter Leukämogenese versteht man die maligne Entartung einer oder mehrerer hämatopoetischer Vorläuferzellen. Aufgrund molekulargenetischer Veränderungen innerhalb dieser Zellen kommt es zu einer unkontrollierten klonalen Expansion. Diese maligne Proliferation führt zu einer Akkumulation unreifer Blasten und zur Verdrängung normaler Blutzellen.

Gilliland postulierte die sogenannte „Double-hit-Hypothese“, d.h. dass zur Leukämieentstehung Mutationen in zwei Klassen von Genen stattfinden müssen. Eine Mutation bewirkt einen Differenzierungsarrest und eine weitere Mutation hat eine unkontrollierte Proliferationssteigerung dieser im unreifen Stadium angehaltenen Zelle zur Folge. Chromosomale Rearrangements von relevanten Transkriptionsfaktoren und des „*transcriptional co-activation complexes*“ werden dabei als Klasse-2-Mutationen bezeichnet (beispielsweise Mutationen in Homöobox (*HOX*)-Genen oder *AML1-ETO*-, *PML-RARA*-Translokationen). Mutationen in diesen Genen stören zwar die Differenzierung, können jedoch alleine keine Leukämie auslösen. Dazu sind zusätzlich sogenannte Klasse-1-Mutationen erforderlich, die eine autonome Proliferation und eine klonale Expansion ermöglichen

(beispielsweise Aktivierung der Tyrosinkinase *ABL1*, *FLT3* und *KIT*) (Gilliland, 2001; Gilliland et al., 2004). Durch Komplet-Genomsequenzierungen von Tumorzellen wurde evident, dass das Modell der Zwei-Klassen-Mutationen jedoch in den meisten Fällen unzureichend ist, da an der Pathogenese von Leukämien normalerweise mehr Veränderungen beteiligt sind. Meist scheint eine „Multi-Hit-Hypothese“ zutreffender zu sein, wobei wichtige „*driver*“- von unwichtigeren „*passenger*“- Mutationen unterschieden werden. Proto-Onkogene, die den programmierten Zelltod in der normalen Hämatopoese regulieren, spielen ebenfalls oft eine Rolle in der Pathogenese der Leukämie (Passegué et al., 2003). Mutationen finden meist in Proto-Onkogenen oder Tumorsuppressor-Genen statt, welche in mutierter Form eine gestörte Differenzierung, erhöhte Selbsterneuerung, gesteigerte Proliferation und/oder verminderte Apoptose zur Folge haben (siehe Abbildung 1-2). Zu den von Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen kodierten Proteinen gehören u.a. Transkriptionsfaktoren, Regulatoren des Zellzyklus sowie Proteine diverser Signaltransduktionswege (Futreal et al., 2004). Chromosomenbrüche und -translokationen, welche zur Entstehung onkogener Fusionsproteine führen, stellen weitere Leukämie-induzierende Faktoren dar.



### Abbildung 1-2: Mechanismen der Leukämieentstehung

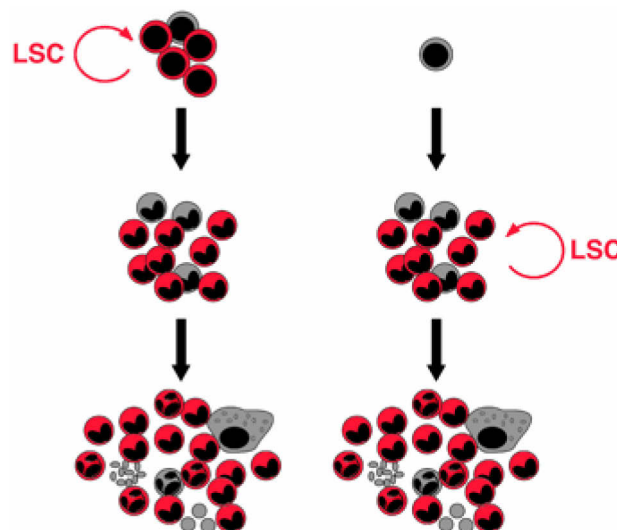
Gestörte Differenzierung, verminderte Apoptoserate, gesteigerte Proliferation, erhöhte Selbsterneuerungsrate und genomische Instabilität. Abbildung modifiziert nach Passegué et al., 2003.

Die schrittweise Akkumulation mehrerer Mutationen führt letztendlich zur Transformation einer gesunden hämatopoetischen Zelle zu einer leukämischen Zelle mit anormaler Zellproliferation und schlussendlich zur Entstehung einer Leukämie. Charakteristisch für den Prozess der Transformation sind eine Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation, verminderte Sensitivität gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen und Inaktivierung pro-apoptotischer Regulatoren. Zusätzlich zu diesen genetischen Veränderungen sind auch epigenetische



Veränderungen wie DNA-Methylierungen, -Demethylierungen und Histonmodifikationen mit resultierender aberranter Genexpression an der Leukämogenese beteiligt (Chen et al., 2010).

Gemäß der Theorie der leukämischen Stammzellen (*leukemic stem cell*: LSC) entsteht eine Leukämie als Folge eines mehrstufigen Prozesses, an dessen Beginn die Entstehung von LSCs steht. LSCs zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Quieszenz aus, während die leukämischen Blasten, welche die Hauptmasse der leukämischen Zellen darstellen, kein Potenzial zur Selbsterneuerung aufweisen. LSCs weisen resistenzvermittelnde Effluxmechanismen auf und sind über die Expression anti-apoptotischer Gene unempfindlich gegenüber Apoptose-Stimuli (Dean et al., 2005; Konopleva et al., 2002). LSCs können aus mutierten HSCs, oligopotenten Progenitorzellen oder aus linienspezifischen Vorläuferzellen entstehen, welche durch Akkumulation verschiedener genetischer Alterationen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wiedererlangt haben (siehe Abbildung 1-3) (Bonnet and Dick, 1997).



**Abbildung 1-3: Entstehung leukämischer Stammzellen**

Durch leukämogene Veränderungen kommt es zur Stammzellexpansion sowie zur genetischen Instabilität der HSC (grau) und letztlich zur Transformation in eine LSC (rot). Des Weiteren können LSCs aus Progenitorzellen hervorgehen, die durch Mutationen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wiedererlangt haben. Abbildung modifiziert nach Passegué et al., 2003.

### 1.3 Akute Leukämien

Leukämien werden entsprechend ihres klinischen Verlaufs in „akute“ oder „chronische“ Leukämien eingeteilt. Die Diagnosestellung einer akuten Leukämie erfordert nach der *World Health Organization* (WHO)-Klassifikation einen Blastenanteil im Knochenmark von mindestens 20 % (Vardiman et al., 2009). Die spezifische Charakterisierung von akuten Leukämien erfolgt mittels Zytomorphologie, Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik. Entarten lymphatische (lymphoblastischen) Vorläuferzellen entsteht eine

lymphatische Leukämie, entarten myeloische (myeloblastische) Vorläufer entsteht eine myeloische Leukämie.

Leukämien sind charakterisiert durch die Expansion eines malignen Zellklons auf Kosten der normalen Hämatopoese. Dies führt zur Anreicherung von malignen, unreifen Blasten im blutbildenden Knochenmark oder zur Infiltration extramedullärer Organe, wie z.B. der Milz oder Leber, mit konsekutiver Verdrängung anderer hämatopoetischer Zelllinien. Die klinische Symptomatik resultiert aus der Verdrängung der normalen Hämatopoese und Entstehung einer Knochenmarksinsuffizienz mit nachfolgender Anämie, Granulozytopenie oder Thrombozytopenie, welche z.B. eine erhöhte Infektanfälligkeit und Blutungsneigung begünstigen können (Hoffbrand et al., 2002).

Das klinische Erscheinungsbild der verschiedenen Formen ist ähnlich, da alle Formen letztendlich die Funktion des Knochenmarks beeinträchtigen, jedoch bestehen starke Unterschiede in Therapierbarkeit und Prognose.

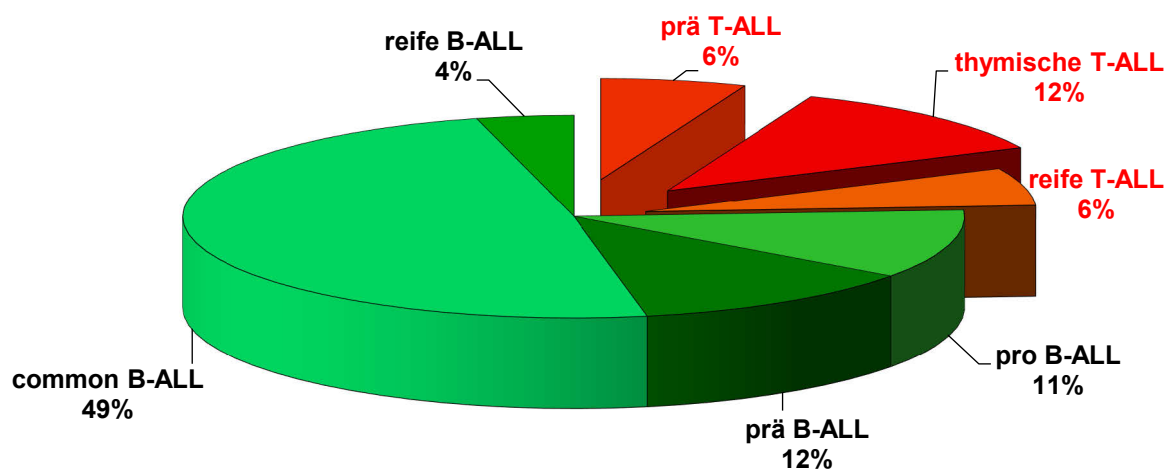
Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters, während die akute myeloische Leukämie (AML) vorwiegend Erwachsene betrifft. Laut SEER-Register (Surveillance, Epidemiology and End Result) liegt die Inzidenz in den USA für AML bei 4 pro 100.000 und für ALL bei 1,7 pro 100.000 Einwohner, wobei davon etwa 42 % adulte ALLs darstellen [2]. In Deutschland existiert kein zentrales Krebsregister, aktuelle Schätzungen gehen von etwa 4300 akuten Leukämie-Neuerkrankungen bei Erwachsenen, davon etwa 700 ALL-Erkrankungen, pro Jahr aus [3].

### **1.3.1 Akute lymphatische Leukämie**

Die akute lymphatische Leukämie kann entsprechend ihrer lymphatischen Vorläuferzelle in die B-lymphoblastische (B-Linien-ALL) oder T-lymphoblastische (T-Linien-ALL) Leukämie unterteilt werden.

Die molekularen Ursachen der Pathogenese sind vielfältig. Aufgrund von Fehlern im Rearrangement der Genloci von Leicht- und Schwerketten der Antigenrezeptoren können Chromosomentranslokationen entstehen, bei denen die Immunglobulin- (bei B-Linien ALL) oder die T-Zell-Rezeptorgene (bei T-Linien ALL) betroffen sind. Infolgedessen kommen die translozierten Gene unter die Kontrolle von Steuersequenzen (*Enhancer*) der Immungene und konsekutiv zur aberranten Expression von Proto-Onkogenen. Durch Translokationen können zudem Fusionsgene mit Onkogen-Aktivität entstehen. Auch der Verlust von Tumorsuppressor-Genen oder die Aktivierung von Onkogenen durch aktivierende Mutationen spielen wichtige Rollen bei der Leukämieentstehung (Armstrong and Look 2005). Weitere Veränderungen können durch Mutationen in Genen für Transkriptionsfaktoren oder auch durch hyperdiploidie, d.h. Vermehrung der Chromosomenanzahl auf über 50, zustande kommen. Dabei

unterscheidet sich die Verteilung der molekularen Ereignisse bei der ALL im Kindesalter stark von denen der ALL im Erwachsenenalter (Faderl et al., 2010).



**Abbildung 1-4: Häufigkeiten der verschiedenen ALL-Subgruppen**

Adulte ALL-Patienten weisen zu 76 % die Ausprägung einer B-lymphatischen ALL, zu 24 % die einer T-lymphatischen ALL auf. Eine weitere Unterteilung erfolgt anhand des Reifegrades der Blasten über Immunphänotypisierung.

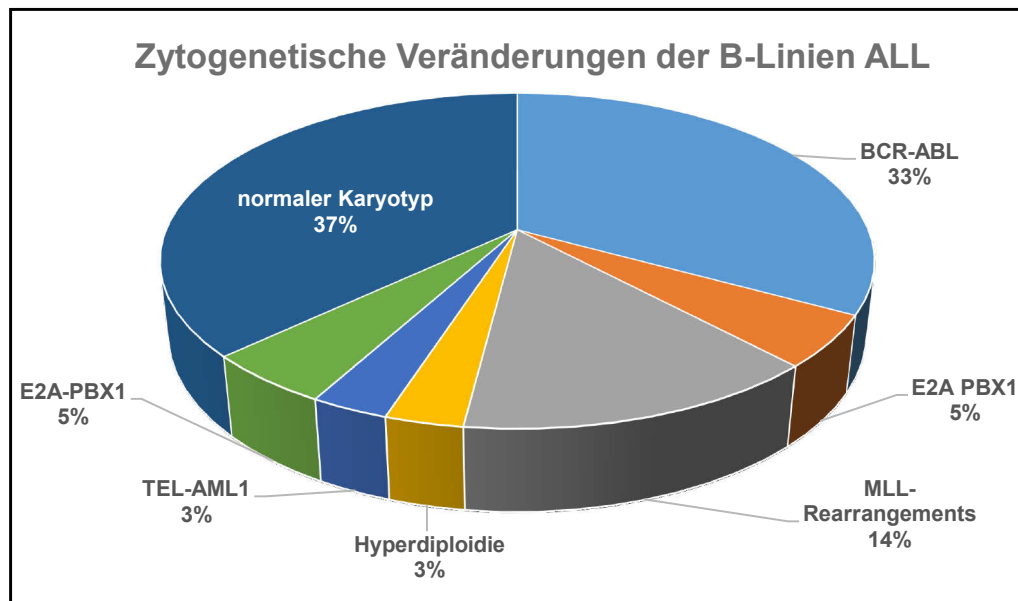
Die Klassifikation der ALL nach morphologischen Subtypen (FAB-Klassifizierung; L1-3) (Bennett et al., 1976) hat im Gegensatz zur AML nie große Bedeutung erlangt und ist hauptsächlich bei der Abgrenzung zur AML und der Identifikation des seltenen L3-Subtypes (ca. 2-3 %) von Bedeutung. Unabdingbar zur Klassifizierung der ALL ist hingegen die genaue Immunphänotypisierung, d. h. die Bestimmung von Oberflächenmarkern, welche Rückschlüsse auf das Differenzierungsstadium der Blasten und eine Zuordnung zur B- oder T-Zellreihe ermöglichen. Auch zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen, wie die Bestimmung verschiedener Translokationen, tragen zur Einteilung der ALL in die verschiedenen Subgruppen bei (siehe Tabelle 1-2).

**Tabelle 1-2: Einteilung der ALL anhand typischer Oberflächenmarker und chromosomaler Aberrationen**

Klassifikation	Inzidenz	Oberflächenmarker (Auswahl)	Typische Aberrationen	
			Zytogenetik	Molekulargenetik
<b>B-Linien ALL</b>	76 %			
pro B-ALL	11 %	CD19+, CD10-, cyIgM-, slg-, TdT+	t(4;11); t(11;19)	MLL-AF4, MLL-ENL
common B-ALL	49 %	CD19+, CD10+, cyIgM-, slg-, TdT+	t(9;22)	BCR-ABL
prä B-ALL	12 %	CD19+, CD10+/-, cyIgM+, slg-, TdT+	t(9;22); t(1;19)	BCR-ABL, E2A-PBX1
reife B-ALL	4 %	CD19+, CD10+/-, cyIgM-, slg+, TdT-	t(2;8); t(8;14); t(8;22)	MYC-IGH
<b>T-Linien ALL</b>	24 %			
prä T-ALL	6 %	CD19-, CD7+, cyCD3+, CD2, CD1a-	t(10;14)	TLX1-TCRA/D
thymische T-ALL	12 %	CD19-, CD7+, cyCD3+/-, CD1a+	t(10;14)	TLX1-TCRA/D
reife T-ALL	6 %	CD19-, CD7+, cyCD3-, CD1a-		

### 1.3.1.1 Akute B-lymphatische Leukämie

Etwa 76 % aller ALLs weisen eine B-Linien Differenzierung auf. In Abhängigkeit des Differenzierungsgrades wird die akute B-lymphatische Leukämie (B-ALL) in die sehr unreife pro B-ALL, gefolgt von der common ALL, prä B-ALL und in die reifzellige B-ALL unterteilt. Als B-Vorläufer-ALL werden pro B, common und prä B-ALL zusammengefasst. Die reife B-ALL kann als die leukämische Manifestation des Burkitt-Lymphoms angesehen werden und wird im Weiteren nicht betrachtet. Charakteristisch für eine B-Vorläufer ALL ist die Expression der B-Zell-Antigene CD19, CD79a, CD20 und CD22 (siehe auch Tabelle 1-2).



**Abbildung 1-5: Zytogenetische Veränderungen in adulter B-ALL (Pui et al., 2004)**

Die häufigste genetische Veränderung der adulten B-ALL ist die Translokation t(9;22)(q34;q11), auch Philadelphia-Translokation genannt, welche zur Fusion des Tyrosinkinasegens *ABL1* (*Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1*) mit dem *BCR*-Gen (*Breakpoint Cluster Region*) führt (Groffen and Heisterkamp, 1987). Die Fusion bewirkt eine dauerhafte Aktivierung der ABL1-Kinase und dies führt zu einer unkontrollierten Proliferation. Die BCR-ABL-Translokation war historisch mit einer sehr ungünstigen Prognose assoziiert (Gleissner et al., 2002), welche sich aber in den letzten Jahren durch den Einsatz spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitoren verbessert hat.

Häufig finden sich auch Translokationen im *MLL* (*mixed lineage leukemia protein*) -Gen, welches als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener *HOX*-Gene aufrechterhält, die ihrerseits eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung spielen. Die häufigste MLL-Translokation bei ALL ist die Translokation t(4;11)(q21;q23) mit resultierendem Fusionsgen *MLL-AF4*, welches ebenfalls mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Cimino et al., 2003). In der B-Linien-ALL liegen zudem oft transkriptionelle Regulatoren der B-lymphoiden Entwicklung hin zu reifen B-Zellen in veränderter Form vor, wie beispielsweise die Transkriptionsfaktoren *PAX5*, *IKZF1* (*IKAROS*), *EBF1* und *LEF1*. Mutationen treten in Form

von Deletionen, Sequenzmutationen und Translokationen auf. Beispiele für Translokationen in Genen für Transkriptionsfaktoren sind die Translokationen t(12;21)(p13;q22) (Fusionsgen *TEL-AML1*) und t(1;19)(q23;p13.3) (Fusionsgen *E2A-PBX1*). Oftmals sind zusätzlich Tumorsuppressor-Gene, Zellzyklus-regulatorische Gene (*CDKN2A*, *PTEN*, *RB1*), Transkriptionsfaktoren und transkriptionelle Coaktivatoren (*ETV6*, *ERG*, *TBL1XR1*), welche in der Reifung und Signaltransduktion von Lymphozyten involviert sind, verändert (Mullighan, 2011).

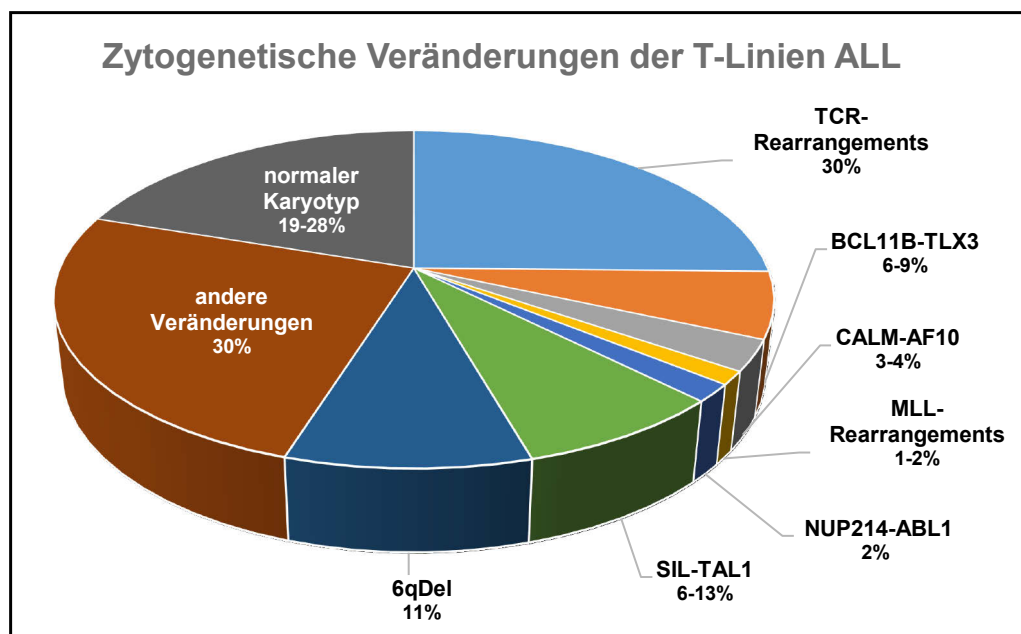
Molekulargenetische Analysen sowie klinische und morphologische Parameter bilden die Grundlage der Risikostratifikation der B-Linien-ALL. Nach dem Therapiestudienprotokoll 07/2003 der deutschen GMALL-Therapiestudiengruppe werden folgende B-Vorläufer-ALLs als Hochrisiko eingeordnet: Leukozytenzahl >30.000 /  $\mu$ l, CD10 negativ, das Vorliegen der MLL-AF4- oder BCR-ABL-Translokation, eine späte komplette Remission und ungünstige Verläufe der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*, MRD).

#### 1.3.1.2 Akute T-lymphatische Leukämie

Die akute T-lymphatische Leukämie (T-ALL) umfasst etwa 25 % der ALLs des Erwachsenenalters (Hoelzer et al., 2002). In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad werden T-lymphoblastische Leukämien in pro, prä, thymische (kortikale) und reife T-ALL unterteilt (siehe Abbildung 1-4).

Gesunde T-Lymphozyten durchlaufen im Reifungsprozess eine Umlagerung der T-Zell-Rezeptor-Gene (*TCR*). Chromosomentranslokationen sind in etwa 35 % der T-ALL-Patienten in diesen Genbereichen (*TCR $\alpha$*  (14q11.2), *TCR $\beta$*  (7q35), *TCR $\gamma$*  (7p11), *TCR $\delta$*  (14q11)) zu finden (Aifantis et al., 2008). Dies hat zur Folge, dass involvierte Gene, beispielsweise Transkriptionsfaktoren der T-Zell Differenzierung, unter den Einfluss von Promotor- oder Enhancer-Elementen der T-Zellrezeptor-Loci gelangen und so deren Expression unkontrolliert erhöht wird. Die gesteigerte Expression der Transkriptionsfaktoren wiederum beeinflusst auch die Expression nachgeschalteter Gene (Armstrong and Look, 2005). Beteiligte Gene sind u.a. das Onkogen *MYC*, Gene des HOXA-Clusters sowie die Gene *TLX1*, *TLX3*, *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *BHLHB1*, *LCK*, *NOTCH*, *LMO1* und *LMO2*.

Eine zentrale Rolle in der normalen T-Zell-Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen kommt dem Protein NOTCH1 zu. In mehr als der Hälfte der T-ALL Patienten liegen *NOTCH1*-Mutationen vor, die zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung des NOTCH-Signalwegs führen. Meist sind diese aktivierenden Mutationen in der Heterodimerisierungsdomäne, der regulativ wirkenden PEST-Sequenz oder in der Transaktivierungs-Domäne des *NOTCH1*-Gens lokalisiert. Weitere aktivierende Mutationen sind beispielsweise in den Signaltransduktions-Genen *NRAS*, *JAK1*, *JAK3* und *FLT3* zu finden (Aifantis et al., 2008; Weng et al., 2004).



**Abbildung 1-6: Zytogenetische Veränderungen in adulter T-ALL (Lafage-Pochitaloff et al., 2014; Marks et al., 2009)**

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass unabhängig von chromosomalen Aberrationen eine abweichende Expression spezifischer Gene (*TLX1*, *TAL1*, *LYL1*, *LMO1*, *LMO2*) eine leukämische Transformation induzieren kann und mit einem Differenzierungsstop auf jeweils unterschiedlichen Reifungsstufen assoziiert ist (Ferrando et al., 2002).

Aus den molekulargenetischen Alterationen lässt sich jedoch nur bedingt eine Risikostratifizierung ableiten. Grundlage der Risikogruppeneinteilung der T-ALL stellt immer noch die Immunphänotypisierung dar, die je nach Antigenprofil eine Einteilung in thymische T-ALL (Standardrisiko) bzw. prä oder reife T-ALL (Hochrisiko) ermöglicht.

**Tabelle 1-3: Zusammenfassung zytogenetischer Veränderungen in der T-ALL nach Lafage-Pochitaloff et al., 2014; Marks et al., 2009; Van Vlierberghe and Ferrando, 2012.**

zytogenetische Veränderung	Fusionsgene / Onkogene	Häufigkeit
Translokationen unter Einbeziehung der <i>TCR</i> -Gene	TLX1, TLX3, TAL1, TAL2, LYL1, LMO1, LMO2, NOTCH1, Cyclin D2	30-35 %
Fusionsgene	CALM-AF10	3-4 %
	SIL-TAL1	6-13 %
	MLL-Fusionen	1-2 %
	NUP214-ABL1	2-4 %
	BCL11B-TLX3	6-9 %
	NOTCH1	>60 %
Aktivierende Genmutationen	FLT3	2-4 %
	NRAS	5-10 %
	JAK1	4-18 %
	JAK3	5 %
	IL7R	10 %
	FBXW7	8-30 %
Inaktivierende Genmutationen		

Deletionen	PTEN	10 %
	RUNX1	10-20 %
	CDKN2A Del	42 %
	6q Del	11 %

### 1.3.2 Therapie und Prognose der akuten lymphatischen Leukämien

Die Therapie von erwachsenen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie erfolgt in Deutschland nach dem GMALL 07/2003 Protokoll. Die Induktionstherapie hat eine komplette Remission (*complete remission*: CR) zum Ziel, die Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie dient der Aufrechterhaltung und Vertiefung der CR. In der Chemotherapie der ALL werden verschiedene Zytostatika eingesetzt, welche besonders stark auf schnell proliferierende Zellen wirken. Wesentliche Bestandteile der Chemotherapie sind DNA-Synthese inhibierende Pyrimidinanaloga wie Cytosinarabinosid in Kombination mit DNA-interkalierenden Anthrazyklinen (Doxorubicin, Daunorubicin etc.). Des Weiteren gehören Mitosehemmer (Vincristin) oder Einzelstrangbrüche induzierende Topoisomerase I-Inhibitoren, sowie RNA-Translation inhibierende Uracil-Analoga, Alkylantien, Asparaginasen, Glucocorticoide und Methotrexat zu den Standardmedikamenten. Zu den neueren Medikamenten in der ALL-Therapie zählen spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Imatinib. Das therapeutische Konzept beinhaltet eine komplexe Abfolge mehrerer Induktions-, Konsolidierungs- sowie Re-Induktionszyklen. Neben der medikamentösen Chemotherapie gehören bei Hochrisiko-Patienten auch autologe und allogene Stammzell-Transplantationen zum Behandlungskonzept. Diese sind maßgeblich an der Elimination maligner Zellen und an dem Erhalt der Remission beteiligt und sind entscheidend für ein verbessertes Langzeitüberleben. Das Überleben unbehandelter BCR-ABL-positiver ALL-Patienten von durchschnittlich 8 Monaten (Secker-Walker et al., 1991) konnte durch die kombinierte Chemotherapie und dem Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) auf ein 3-5 Jahresüberleben von 40-60 % erhöht werden (Brissot et al., 2015; Leoni and Biondi, 2015). Durch den zusätzlichen Einsatz von ABL1-Inhibitoren erreichen über 90 % der ALL-Patienten eine komplette erste Remission, welche die Durchführung der oftmals therapieentscheidenden allogenen Stammzell-Transplantationen ermöglicht. In der GMALL-Studie überlebten nur 14 % der ALL-Patienten ohne Transplantation und 57 % mit Transplantation (Mathisen et al., 2011).

Trotz intensiver Therapie beträgt das 5-Jahres-Gesamtüberleben von erwachsenen Patienten mit ALL zur Zeit im Mittel weiterhin nur etwas über 50 % und hängt stark von Alter und Subtyp ab (Gökbuget and Hoelzer, 2009). Um eine exakte Risikoklassifizierung zu ermöglichen und effektivere Therapieansätze zu entwickeln, ist es unabdingbar neue prognostische Marker und molekulare Ziele zu identifizieren, so dass eine angepasste Therapie erfolgen kann. Ein

Ansatz hierzu ist die Entwicklung Target-spezifischer Medikamente, wie z.B. den Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Glivec®, Novartis) für BCR-ABL-positive ALL.

## 1.4 Tyrosinkinasen

Tyrosinkinasen (TK) sind Enzyme der Signaltransduktion, welche durch Tyrosin-Phosphorylierung ihrer Zielproteine deren Aktivitätszustand verändern. Tyrosinkinasen lassen sich in zwei Klassen aufteilen, die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und zytoplasmatischen Tyrosinkinasen („*Non-Receptor*“ Tyrosinkinasen, NRTK). Im menschlichem Genom wurden 86 Tyrosinkinase-Gene identifiziert, wobei 54 für RTK und 32 für NRTK kodieren (Robinson et al., 2000). Alternative Namen, welche für die Tyrosinkinasen verwendet werden, sind in Tabelle 8-1 des Anhanges aufgelistet.

**Tabelle 1-4: Liste der Tyrosinkinasen**

Rezeptor-Tyrosinkinasen (54)		Zytoplasmatische Tyrosinkinasen (32)	
AATYK-Familie	AATK	ABL-Familie	ABL1, ABL2
ALK-Familie	ALK, LTK	ACK-Familie	TNK1, TNK2
AXL-Familie	AXL, MERTK, TYRO3	CSK-Familie	CSK, MATK
DDR-Familie	DDR1, DDR2	FAK-Familie	PTK2, PTK2B
EGFR-Familie	ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4	FES-Familie	FER, FES
EPH-Familie	EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB6	FRK-Familie	PTK6, FRK, SRMS
FGFR-Familie	FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4	JAK-Familie	JAK1, JAK2, JAK3, TYK2
INSR-Familie	IGF1R, INSR, INSRR, ROS1	SRC-A-Familie	FGR, FYN, SRC, YES1
MET-Familie	MET, MST1R	SRC-B-Familie	BLK, HCK, LCK, LYN
MUSK-Familie	MUSK	TEC-Familie	BMX, BTK, ITK, TEC, TXK
PDGFR-Familie	CSF1R, KIT, FLT3, PDGFRA, PDGFRB	SYK-Familie	SYK, ZAP70
PTK7-Familie	PTK7		
RET-Familie	RET		
ROR-Familie	ROR1, ROR2		
RYK-Familie	RYK		
TIE-Familie	TEK, TIE		
TRK-Familie	NTRK1, NTRK2, NTRK3		
VEGFR-Familie	FLT1, KDR, FLT4		

### 1.4.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen bilden eine Superfamilie von Zellmembran-Proteinen, welche aufgrund struktureller Charakteristika oder gemeinsamer Liganden in Subfamilien unterteilt werden können (Blume-Jensen and Hunter, 2001; van der Geer et al., 1994). Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinasen sind Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone, deren Signale sie in das Innere der Zelle weiterleiten. Somit sind RTK Schlüsselregulatoren normaler zellulärer



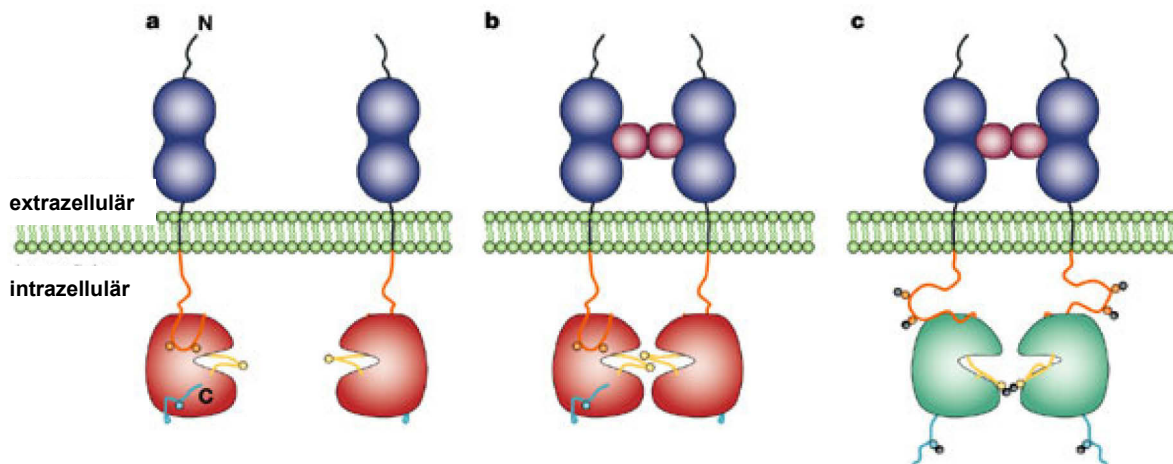
Prozesse und beeinflussen Zellzyklus, Zellüberleben, Apoptose, Proliferation und Differenzierung.

Rezeptor-Tyrosinkinasen sind aus einer extrazellulären amino (N)-terminalen Liganden-bindenden Region, einer Transmembranhelix und einer zytoplasmatischen carboxy (C)-terminalen Domäne aufgebaut. Die extrazelluläre Domäne besteht aus verschiedenen konservierten Elementen, wie Ig-like oder EGF-like Domänen und bildet die spezifische Bindungsstelle für die entsprechenden Liganden. Die intrazelluläre Domäne beinhaltet den enzymatisch aktiven Proteinteil, die Tyrosinkinase-Domäne (TKD), die ATP-Bindungsstelle sowie die juxtamembrane und C-terminale regulatorische Region. Die Kinase-Domäne katalysiert die Autophosphorylierung, die zur Aktivierung des Rezeptors führt, und die Phosphorylierung von Substraten zur Signalweiterleitung (Lemmon and Schlessinger, 2010; Yarden and Ullrich, 1988).

#### 1.4.1.1 Mechanismen der Rezeptor-Aktivierung

Rezeptor-Tyrosinkinasen werden erst infolge der Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne aktiviert. Die Aktivierung erfolgt dabei über verschiedene Konformationsänderungen. Einige RTK werden über Dimerisierung der einzeln vorliegenden Monomere, welche ausschließlich über den Liganden verbunden werden, aktiviert (z.B. NTRK1), andere RTK liegen als inaktive Dimere vor und die Ligandenbindung festigt die aktive Konformation (z.B. ERBB-Familie). Zwischen diesen beiden Möglichkeiten sind zahlreiche weitere Abstufungen möglich (z.B. KIT und FGFR) (Lemmon and Schlessinger, 2010). Die Liganden sind oftmals bivalente Dimere, welche über die gleichzeitige Bindung zweier Rezeptoren eine Dimerisierung (Homo- oder Heterodimerisierung) der extrazellulären Domänen vermitteln und die zytoplasmatischen Domänen in räumliche Nähe bringen. Der niedrige basale Aktivitätszustand ist dann ausreichend für eine gegenseitige *trans*-Phosphorylierung der Tyrosinreste im Aktivierungssegment, in der Juxtamembran-Domäne (JM-Domäne) und am C-terminalen Ende (Heldin, 1995; Ullrich and Schlessinger, 1990) (siehe Abbildung 1-7).

Das Aktivierungssegment der TKD besteht aus einer Aktivierungsschleife („*activation loop*“), die in der Nähe des katalytischen Zentrums lokalisiert ist, und dem *P+1 loop*, welcher oftmals zur Substratbindung dient. Dieses Segment, welches etwa 20 - 25 Aminosäuren mit 1 - 3 Tyrosin-Phosphorylierungsstellen umfasst, interagiert im unphosphorylierten Zustand direkt mit der Kinase und blockiert den Zugang von Proteinsubstraten und/oder ATP zum aktiven Zentrum. Nach Tyrosinphosphorylierung des aktiven Zentrums wird diese autoinhibitorische Interaktion unterbrochen, die Aktivierungsschleife nimmt eine „offene“ Position ein und erlaubt ATP und Protein-Substraten den Zutritt (Hubbard and Till, 2000).



**Abbildung 1-7: Autoinhibition und Aktivierung von Tyrosinkinasen**

**a:** In Abwesenheit von Liganden liegt die TKD (rot) über die inhibitorische Interaktion der Juxtamembran-Domäne (orange) und/oder des C-terminalen Schwanzes (blau) in einem Zustand niedriger basaler Aktivität vor. Zusätzlich ist das Aktivierungssegment (gelb) für die Katalyse nicht optimal positioniert.

**b:** Nach der Liganden (lila)-vermittelten Dimerisierung der extrazellulären Domäne (blau) befinden sich die zytosomatischen Domänen in räumlicher Nähe. Dies ermöglicht eine *trans*-Phosphorylierung von Tyrosinresten in der Juxtamembran-Region, im Aktivierungssegment und im C-terminalen Schwanz.

**c:** Nach Phosphorylierung und Rekonfiguration der inhibitorischen Segmente werden die Kinasedomänen aktiviert (grün) und ein Teil der Phosphotyrosine (schwarze Kreise) werden als Rekrutierungsstellen für Proteine mit SH2- oder PTB-Domänen verfügbar. Abbildung verändert nach Hubbard, 2004.

Neben diesem regulatorischen Mechanismus, der beispielsweise in den FGF-, Insulin und IGF1-Rezeptoren zu finden ist, tragen in vielen RTK noch weitere Regionen zur Autoinhibition bei: in KIT, PDGF- und EPH-Rezeptoren interagiert beispielsweise die JM-Domäne mit Elementen des katalytischen Zentrums und stabilisiert die inaktive Konformation. Durch *trans*-Phosphorylierungen innerhalb der JM-Domäne wird diese *cis*-Autoinhibition unterbrochen. Bei der C-terminalen Inhibition interagiert entsprechend der unphosphorylierte C-Terminus mit dem aktiven Zentrum (z.B. Tie1 und 2). Die allosterische Aktivierung der EGF-Rezeptoren kommt über den direkten Kontakt einer TKD, dem „Aktivator“, mit einer anderen TKD, dem „Empfänger“ zustande. Dabei destabilisiert die Aktivator-TKD die autoinhibitorische Interaktion der Aktivierungsschleife (Hubbard, 2004; Lemmon and Schlessinger, 2010; Shewchuk et al., 2000).

Mutationen in diesen autoinhibitorischen Segmenten können zu einer konstitutiven Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen führen. Derart aktivierende Mutationen in der KIT/PDGFR-Familie werden regelmäßig in Karzinomen gefunden (Dibb et al., 2004), die JM-Domäne von FLT3 ist häufig in Leukämien mutiert (Kiyoi and Naoe, 2002).

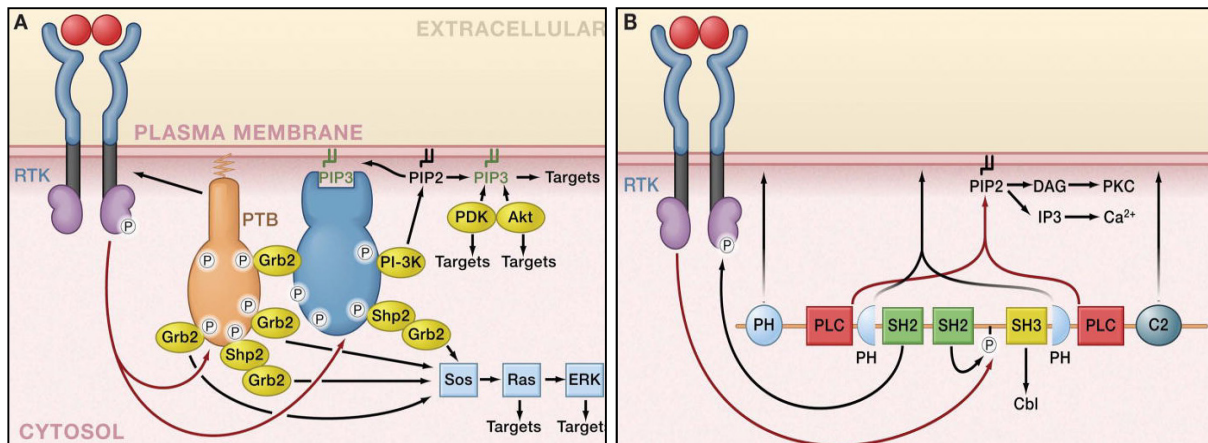
Die Regulation der Tyrosinkinaseaktivität erfolgt über zahlreiche verschiedene Mechanismen. Eine Verringerung oder Termination der TK-Aktivität kann über antagonistische Liganden, Hetero-Oligomerisierung mit inaktiven Rezeptor-Varianten, die Bindung von Proteinen, welche die Signaltransduktion verhindern oder über Rezeptor-Endozytose und Degradation erfolgen. Insbesondere stellen aber die Protein-Tyrosinphosphatasen (PTP) die Gegenspieler der Tyrosinkinasen dar, welche kontinuierlich deren Aktivität regulieren. PTPs dephosphorylieren

die aktivierenden Phosphatreste im aktiven Zentrum und inaktivieren diese somit. Werden diese im Experiment durch PTP-Inhibitoren ausgeschaltet, kommt es zu einer Aktivierung aller Tyrosinkinassen. Weiterhin erfolgt die Inaktivierung oftmals über negative Rückkopplungs-Mechanismen (Schlessinger, 2000).

#### **1.4.1.2 Signalwirkung von Rezeptor-Tyrosinkinassen**

Die Autophosphorylierungen finden in der TK-, JM- und C-terminalen Domäne statt. Eine essentielle Funktion der Phosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors besteht neben der Aktivierung der Kinase-Domäne in der Bildung von Rekrutierungsstellen für Proteine nachgeschalteter Signalwege. Diese Rekrutierungsstellen werden durch die Autophosphorylierung als Bindestellen für zytoplasmatische Signalmoleküle mit Phosphotyrosin-Erkennungsdomänen, wie beispielsweise SRC homologen 2 (SH2)-Domänen oder Phosphotyrosinbindungs (PTB)-Domänen erkannt (Pawson, 1995). Rezeptor-Tyrosinkinassen haben 5 - 12 Autophosphorylierungsstellen, von denen jede verschiedene Proteine mit SH2- oder PTB-Domänen rekrutiert. Einige Proteine binden direkt an RTK, werden durch Phosphorylierung aktiviert und aktivieren ihrerseits weitere Signalkaskaden (z.B. SRC, Phospholipase C $\gamma$ ). Andere Proteine agieren als Adapterproteine, welche selbst keine enzymatische Aktivität besitzen, den Rezeptor aber mit verschiedenen Substraten verknüpfen. So werden ganze Signalwege über Gerüstproteine als Plattformen in einem Komplex mit Rezeptor-Tyrosinkinassen als zentrale Regulatoren verbunden, welche die Signalproteine phosphorylieren und aktivieren (z.B. MAPK-Kaskade, cAMP abhängige Wege über Proteinkinase A) (Pawson and Schlessinger, 1993). Über die multiplen Phosphotyrosine und unter Einbeziehung mehrerer Adapter- und Gerüstproteine kann ein aktivierter Rezeptor eine große Anzahl verschiedener Signalmoleküle rekrutieren. Daher kann man sich aktivierte RTK als Knoten in einem komplexen Signalnetzwerk vorstellen, welche Informationen vom Extrazellularraum ins Zellinnere weiterleiten (Lemmon and Schlessinger, 2010).

Die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinassen beeinflusst über verschiedene Wege den Stoffwechsel der Zelle und die Transkription im Zellkern und damit auch Wachstum, Apoptose und Zellüberleben. Wichtige Signaltransduktionswege sind beispielsweise die Ras/Raf-, MAPK/ERK-, cAMP- und IP3/DAG-Signalwege. Am Ende der Signalkaskaden steht die Veränderung der Expression verschiedener Gene im Zellkern und die Beeinflussung des Zellmetabolismus über Steuerung der Aktivität von Enzymen im Zytoplasma.



**Abbildung 1-8: Beispiel für RTK-Signalkaskaden anhand des FGF-Rezeptors**

**A:** Die Multiprotein-Komplexe an aktivierten RTK stellen Verzweigungspunkte im Signalnetzwerk dar. Das Adapterprotein FGF-R-substrat-2 (FRS2α) bindet über seine PTB-Domäne an den FGF-Rezeptor und wird von diesem an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert. Diese Phosphotyrosine rekrutieren wiederum das Adapterprotein Grb2 und die Tyrosinphosphatase SHP2, welche ein weiteres Adapterprotein, Gab1, in den Komplex einbringt. Das phosphorylierte Gab1 rekrutiert weitere Signalproteine, wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K).

**B:** Die verschiedenen Domänen der Phospholipase Cγ (PLCγ) erlauben die Integration multipler Signale an der Plasmamembran. Die N-terminale SH2-Domäne bindet an den aktivierten Rezeptor, die C2- und PH-Domänen sind zusammen mit der SH2-Domäne für die Membranlokalisation zuständig. Die Phosphorylierung von PLCγ aktiviert die Lipase, was zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) und zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) führt. Abbildung nach Lemmon and Schlessinger, 2010.

### 1.4.2 Zytoplasmatische Tyrosinkinasen

Auch zytoplasmatische Tyrosinkinasen nehmen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellzyklus, Proliferation, Differenzierung, Metabolismus und Zellüberleben ein. NRTK sind Teil zellulärer Signalkaskaden und werden ebenfalls durch verschiedene Signale, wie Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert. NRTK sind zudem an der Rezeptor-vermittelten Transmembran-Signalübertragung beteiligt, indem sie als Untereinheit von Rezeptoren mit oder ohne intrinsische TK-Aktivität agieren und auf Ligandenbindung hin aktiviert werden. Eine besondere Bedeutung bei der Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen haben die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen BLK, BTK, FES, FGR, ITK, JAK3, LCK, LYN, SYK und ZAP70. Beispielsweise ist ZAP70 für die Signaltransduktion des T-Zellrezeptors (TCR), LYN für die des B-Zellrezeptors essentiell. Die NTRKs CSK, FYN, JAK1, JAK2, PTK2, SRC, TYK2 und YES1 werden ubiquitär exprimiert (Neet and Hunter, 1996). Janus-Kinasen sind für die Signalübertragung vieler katalytisch inaktiver Zytokin-Rezeptoren unerlässlich.

Die meisten NRTK werden über Phosphorylierung aktiviert und phosphorylieren ihrerseits die Tyrosinreste anderer Effektorproteine. Neben der Aktivierung über Phosphorylierung der Aktivierungsschleife können NRTK über Dephosphorylierung eines regulatorischen C-terminalen Tyrosins (z.B. SRC) oder über die Bindung an Liganden, wie beispielsweise die Bindung von SYK- und JAK-Kinasen an katalytisch inaktive Zytokin-Rezeptoren, aktiviert werden.

Zytoplasmatische Tyrosinkinasen sind aus einer Tyrosinkinase-Domäne und einer unterschiedlichen Kombination von SH2-, SH3-, und PH-Domänen aufgebaut. Zusätzlich weisen einige NRTKs spezifische Domänen für Protein-Protein Interaktionen auf, wie die FERM-Domäne der Janus-Kinasen, welche die Bindung an Zytokin-Rezeptoren vermittelt, die Integrin-bindende Domäne und fokale Adhäsions-Domäne der FAK-Familie oder die DNA-bindende Domäne von ABL1.

Die NRTK sind im Zytosol, im Zellkern oder an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Einige NRTK bewegen sich zwischen verschiedenen subzellulären Kompartimenten. Beispielsweise dienen die JAK-Kinasen über den JAK/STAT-Weg der Signalübertragung aus dem Zytosol in den Zellkern, wo diese die Transkription beeinflussen.

Aufgrund der wichtigen zellulären Funktionen wird die Aktivität von zytoplasmatischen Tyrosinkinasen streng reguliert. Genetische Veränderungen, welche zu einer abnormalen Signaltransduktion, zum Verlust autoinhibitorischer Prozesse oder zur Überexpression führen, sind an der Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen beteiligt (Krause and Van Etten, 2005) und stellen dementsprechend wichtige therapeutische Ziele dar.

### **1.4.3 Tyrosinkinase-Familien mit elementaren Funktionen in der Hämatopoese und Leukämogenese**

#### **1.4.3.1 Janus-Kinasen**

Die vier zytoplasmatische Janus-Kinasen JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Zytokinrezeptor-Signaltransduktion bei der Blutbildung und für die Immunantwort. Zytokine beeinflussen Proliferation und Differenzierung und spielen eine entscheidende Rolle während der Hämatopoese. Eine konstitutive Aktivierung über Mutationen und Translokationen ist mit einer Vielzahl verschiedener hämatologischer Erkrankungen assoziiert, beispielsweise in myeloproliferativen Erkrankungen (JAK2), ALL (JAK2), AML (JAK2, JAK1), akute megakaryoblastische Leukämie (JAK2, JAK3) und T-ALL (JAK1). Diese Mutationen bewirken eine aberrante Aktivierung der JAK-STAT-, PI3K- und MAPK-Signalwege. Loss-of-Funktion Mutationen in JAK3 und TYK2 hingegen bewirken Immundefizienzen. JAK-Inhibitoren werden in klinischen Studien verschiedener leukämischer Erkrankungen getestet (Chen et al., 2012; Vainchenker et al., 2008).

#### **1.4.3.2 Ephrin-Rezeptoren**

Die Ephrin-Rezeptoren sind in zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse involviert. Ihre Liganden sind Mitglieder der Ephrin-Familie, welche eine große Diversität, Gewebe-spezifische Expressionsmuster und überlappende Rezeptorspezifitäten aufweisen. Da sowohl Liganden als auch Rezeptoren membrangebunden vorliegen, spielen EPH-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell Kommunikation. Es werden sowohl

onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften der EPH-Familie diskutiert (Pasquale, 2010). In hämatopoetischen Stammzellen (HSC) werden eine Vielzahl verschiedener Ephrine und deren Rezeptoren exprimiert und es wird eine Funktion dieser bei Zelladhäsion, Migration und Differenzierung vermutet. Auch stehen verschiedene Ephrine und deren Rezeptoren im Zusammenhang mit Stammzell-Positionierung und Interaktion mit den Stromazellen des Knochenmarks (Nguyen et al., 2015).

### **1.4.3.3 Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptoren (VEGFRs)**

Die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (*vascular endothelial growth-factor receptors*, VEGFRs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Vaskularisierung und Angiogenese. FLT1 (VEGFR1) wird für die Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen und die Migration von Monozyten und Makrophagen benötigt, während KDR (VEGFR2) und FLT4 (VEGFR3) für die Funktion vaskulärer Endothelzellen und lymphatischer Zellen wichtig sind. KDR ist in normale und pathologische vaskulär-endotheliale Zellentwicklung involviert. FLT1 reguliert die Migration von HSCs und KDR rekrutiert zirkulierende Endothelvorläuferzellen zu Stellen aktiver Angiogenese, welche entscheidend für Wachstum, Progression und Metastasierung solider Tumore ist. Auch bei der Entwicklung hämatologischer Erkrankungen spielen sie eine wichtige Rolle und die Expression von VEGFRs ist in verschiedenen Leukämien erhöht. Die Inhibition von VEGFR-Signalwegen wurde in verschiedenen klinischen Studien getestet (Song et al., 2012).

### **1.4.3.4 SRC-Kinasen**

Die SRC-Familie von Kinasen (SFKs) sind pleiotrope Kinasen, welche in viele zelluläre Vorgänge involviert sind. Zu den SFKs werden acht verschiedene Mitglieder gezählt: SRC, FYN, YES1, FGR, LYN, HCK, LCK und BLK. SFKs beinhalten neben der Tyrosinkinase-Domäne eine SH3- und SH2-Domäne und sind über Myristylierung und Palmitoylierung an der inneren Plasmamembran in der Nähe zu Aktivatoren und Substraten befestigt. SFKs werden durch Wachstumsfaktor- und Zytokin-Rezeptoren, zelluläre Anheftung oder Antigen-Bindung aktiviert. Während *SRC*, *FYN* und *YES1* ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression von *LYN*, *HCK*, *FGR*, *BLK* und *LCK* zum größten Teil auf hämatopoetische Zellen beschränkt (Abram and Courtneidge, 2000). SFKs nehmen Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Adhäsion, Zellüberleben, Differenzierung, Angiogenese, Immunfunktion, Invasion und Zellbeweglichkeit. Die Aktivität von SFKs ist in vielen Karzinomen gesteigert und wichtig für die maligne Progression und Metastasierung (Gelman, 2011). In BCR-ABL-positiver ALL ist die Aktivierung der SRC-Kinasen HCK, LYN und FGR unabhängig von der BCR-ABL-Kinaseaktivität und bietet eine Erklärung für die reduzierte Sensitivität BCR-ABL-positiver ALL gegenüber ABL-Inhibitoren im Vergleich zum Ansprechen der ebenfalls BCR-

ABL-positiven CML (Li, 2007). Weiterhin konnte eine abnormale Aktivität von SFKs mit Imatinib- und Dasatinib-Resistenzen korreliert werden (Hayette et al., 2011).

#### **1.4.4 Bedeutung von Tyrosinkinasen als Medikamentenziele bei malignen Erkrankungen**

Da Tyrosinkinasen eine entscheidende Rolle bei der normalen Regulation vieler zellulärer Prozesse spielen, kann eine Dysregulation ihrer Aktivität zur Entstehung von Leukämien und anderen malignen Erkrankungen beitragen.

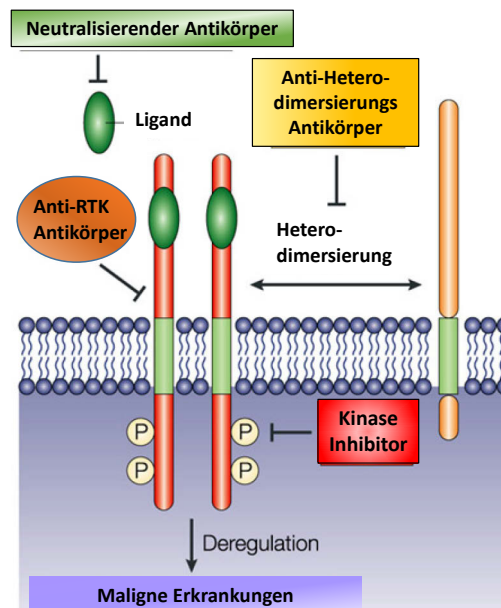
In 25 % der adulten ALLs (Shawver et al., 2002) und bei 95 % der chronischen myeloischen Leukämien (CML) ist die Translokation t(9;22) zu finden, wodurch das BCR-ABL-Fusionsprotein mit konstitutiv aktiver Tyrosinkinase ABL1 entsteht (Faderl et al., 1999). Dadurch werden Signalwege verändert, welche ihrerseits Proliferation, Zellüberleben und Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen kontrollieren. Die FLT3 Rezeptor-Tyrosinkinase, welche eine entscheidende Rolle in der Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen spielt, ist durch eine interne Tandem-Duplikationen (ITD) oder Punktmutationen im Aktivierungssegment bei etwa 30 % der AML-Patienten konstitutiv aktiviert und in nahezu allen Patienten verstärkt exprimiert (Gilliland and Griffin, 2002). Auch die Januskinasen JAK1 und JAK2 werden in Leukämien verändert vorgefunden. So tragen 7 % der pädiatrischen Hochrisiko B-ALL Patienten JAK2-Mutationen und 4-18 % der T-ALL-Patienten JAK1-Mutationen (Vainchenker et al., 2008).

Zudem spielen aktivierte Tyrosinkinasen oftmals eine wichtige Rolle bei der Pathogenese solider Tumore. So sind die Kinasen der EGFR-Familie in den meisten soliden Tumoren, wie Brust-, Nieren-, und Darmkarzinomen oder im kleinzelligem Lungenkarzinom aktiviert oder verstärkt exprimiert (Normanno et al., 2006). Die Überexpression von ERBB2 (Her2) findet sich bei 15-30 % der Mammakarzinome. Eine verstärkte Aktivität von Tyrosinkinasen korreliert hier häufig mit einer schlechten Prognose (Mitri et al., 2012).

Aufgrund der Bedeutung deregulierter Tyrosinkinasen und der Möglichkeit einer spezifischen Inhibition sind diese zu interessanten Medikamentenzielen bei der Behandlung maligner Erkrankungen geworden.

Tyrosinkinase-Inhibitoren können in zwei Klassen aufgeteilt werden: niedermolekulare Inhibitoren (engl.: *small molecule inhibitors*) und Antikörper. Die Inhibitoren können über verschiedene Mechanismen wirken: sie können an die extrazelluläre Domäne binden und so eine Ligandenbindung oder Dimerisierung verhindern, den Liganden direkt binden oder das aktive Zentrum blockieren. Eine Inhibition der extrazellulären Rezeptor-Domäne ist ohne Zellmembranpassage der Medikamente möglich. Die meisten niedermolekularen Inhibitoren

binden jedoch an die ATP-Bindestelle, blockieren diese und inhibieren somit die Kinaseaktivität.



**Abbildung 1-9: Tyrosinkinase-Inhibition**

Die Deregulation des RTK-Signalnetzwerks ist entscheidend beteiligt an der Entstehung maligner Erkrankungen. Neutralisierende Antikörper, welche die Bioaktivität von RTK-Liganden blocken, RTK-spezifische Antikörper, welche die Rezeptor-Heterodimerisierung zum Ziel haben und niedermolekulare Inhibitoren der RTK-Kinaseaktivität interferieren mit der RTK-Signaltransduktion. Abbildung verändert nach Gschwind et al., 2004.

Viele verschiedene Tyrosinkinase-Inhibitoren sind bereits für die Behandlung von Brust-, Lungen-, Pankreas- und Nierenkarzinomen, gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) und CML zugelassen (siehe Tabelle 1-5) oder befinden sich in klinischen Studien (siehe Tabelle 1-6). Der Vorteil von TK-Inhibitoren liegt in ihrer spezifischen Wirkung gegenüber bestimmten Proteinen, welche vor allem in der entarteten Zelle exprimiert werden und dort eine wichtige oder essentielle Rolle im Tumorwachstum einnehmen. Aufgrund ihrer Spezifität beeinflussen sie bevorzugt die Funktion dieser malignen Zellen und in geringerem Maße die von gesunden Zellen. Daher haben sie meist ein geringeres Nebenwirkungsspektrum als herkömmliche Zytostatika.

Besonders bei malignen Erkrankungen, welche hauptsächlich durch Tyrosinkinase-Alterationen ausgelöst werden, wie BCR-ABL in CML und ALL, erzielen Tyrosinkinase-Inhibitoren eine gute Langzeitwirkung mit moderater Toxizität (Druker et al., 2006). Die BCR-ABL-positiven Leukämiezellen sind von dessen Überaktivität abhängig, so dass die Zellen durch die Inhibition von ABL1 stark in ihrer Proliferations- und Überlebensfähigkeit beeinträchtigt werden. Da die konstitutiv aktivierten Signaltransduktions-Kaskaden in der Leukämogenese von großer Bedeutung sind, wird der Einsatz von TK-Inhibitoren in klinischen Studien getestet, bzw. bildet in der Therapie der CML bereits seit vielen Jahren den therapeutischen Standard.

Oftmals liegen auch multiple Defekte und Überexpressionen verschiedener RTK vor. Dort wäre es eventuell von Vorteil mehrere Kinasen gleichzeitig inhibieren zu können. Multikinase-



Inhibitoren haben ein breiteres Aktivitätsspektrum, aber unter Umständen auch wesentlich stärkere Nebenwirkungen. Voraussetzung für eine angepasste Therapie sind möglichst detaillierte Kenntnisse der pathologischen molekularen Veränderungen.

**Tabelle 1-5: Auswahl zugelassener Tyrosinkinase-Inhibitoren**

ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; CEL: chronische eosinophile Leukämie; CLL: chronische lymphatische Leukämie; CML: chronische myeloische Leukämie; CMML: chronische myelomonozytische Leukämie; FL: follikuläres Lymphom; GIST: gastrointestinale Stromatumoren; NSCLC: nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (Hojjat-Farsangi, 2014; Levitzki, 2013).

Tyrosinkinase Inhibitor	Handelsname	Ziel-Tyrosinkinase	maligne Erkrankung (Beispiel)
<b>niedermolekulare Inhibitoren</b>			
Afatinib	Giotrif®	ERBB1-4	NSCLC, Mammakarzinom
Axitinib	Inlyta®	VEGFR-Familie, PDGFRs, KIT	Nierenzellkarzinom
Bosutinib	Bosulif®	ABL, SRC, PDGFR, KIT	CML
Cediranib	Recentin®	VEGFR-Familie	NSCLC, Nierenzellkarzinom, kolorektales Karzinom
Dasatinib	Sprycel®	ABL1/2, CSF1R, KIT, DDR1/2, PDGFRs, SRC, EphRs, BMX, BTK, TEC, TYK2, EGFR, ERBB2/4, FGR, MAPKs, PTK2, PTK6, BLK, CSK, FRK, FYN, HCK, LCK, LYN, RET, YES1	CML BCR-ABL+ ALL
Gefitinib	Iressa®	ERBB1	NSCLC, AML
Ibrutinib	Imbruvica®	BTK	CLL, FL, Mantelzelllymphom, kleinzelligen B-Zell-Lymphom
Imatinib	Glivec®	ABL1/2, DDR1/2, KIT, PDGFRs, LCK	CML, GIST, BCR-ABL+ ALL, CMML, CEL
Lapatinib	Tykerb®	ERBB1, 2, 4	Mammakarzinom
Lenvatinib	Lenvima®	KDR, FLT4	Schilddrüsenkarzinom
Nilotinib	Tasigna®	ABL1/2, CSF1R, KIT, PDGFRs, DDR1/2	CML
Pazopanib	Votrient®	VEGFRs, PDGFRs, KIT	Nierenzellkarzinom
Ponatinib	Iclusig®	ABL1/2, PDGFRA/B, DDR1/2, SRC, FLT3, VEGFRs, KIT, FGFR1/2/3, TEK, BLK, CSK, FRK, FYN, YES1, EphRs, HCK, LYN, RET, CSF1R	CML BCR-ABL+ ALL
Ruxolitinib	Jakavi®	JAK1/2, TYK2	Polycythaemia vera, Myelofibrose
Sorafenib	Nexavar®	VEGFRs, PDGFRB, FLT3, KIT, RET, CSF1R	Nierenzellkarzinom, Leberzellkarzinom
Sunitinib	Sutent®	KIT, VEGFRs, PDGFRs, FLT3, RET, CSF1R	Nierenzellkarzinom, GIST, endokrine Pankreastumore
Vandetanib	Caprelsa®	FLT1, KDR, RET, FGFR, ERBB1, TIE2	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
<b>Monoklonale Antikörper</b>			
Bevacizumab	Avastin®	VEGFRs	Bronchialkarzinom, Kolorektales Karzinom
Cetuximab	Erbitux®	ERBB1	Kolorektales Karzinom
Panitumumab	Vectibix®	ERBB1	Kolorektales Karzinom
Trastuzumab	Herceptin®	ERBB2	Mammakarzinom

**Tabelle 1-6: In klinischen Studien befindliche Tyrosinkinase-Inhibitoren**

ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; CML: chronische myeloische Leukämie; GIST: gastrointestinale Stromatumoren; NSCLC: nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom

Tyrosinkinase-Inhibitor	Ziel-Tyrosinkinase	maligne Erkrankung (Beispiel)	Literatur
<b>niedermolekulare Inhibitoren</b>			
AZD4547	FGFR1, 2, 3	FGFR-Translokationen/-Mutationen	(Gavine et al., 2012)
BGJ398	FGFR1, 2, 3	FGFR-Translokationen/-Mutationen	(Guagnano et al., 2011)
BMS-536924	INSR, IGF1R	Mammakarzinom	(Wittman et al., 2005)
BMS-690514	ERBB1, 2, 4, FLT1, KDR, FLT3	metastasierende solide Tumore, NSCLC	(Marathe et al., 2010)
Canertinib	ERBB1,2,4	Kopf und Hals Tumore, NSCLC, Mammakarzinom	(Slichenmyer et al., 2001)
CP-673451	PDGFRa, b	NSCLC, Kolonkarzinom, Glioblastom	(Xi et al., 2014)
Crenolanib	FLT3, PDGFRa, b, KIT	AML, GIST, Gliom	(Muralidhara et al., 2012)
Defactinib	PTK2	solide Tumore	(Jones et al., 2015)
KX01	SRC	Mammakarzinom, Prostatakarzinom	(Fallah-Tafti et al., 2011)
Lestaurtinib	FLT3, JAK2, NTRK1, 2, 3	AML, ALL, myeloproliferative Erkrankungen	(Fathi and Levis, 2009)
Linifanib	VEGFR, PDGFR	Leberzellkarzinom, NSCLC	(Aversa et al., 2015; Dai et al., 2007)
LY2874455	FGFR1, 2, 3, 4	solide Tumore	(Zhao et al., 2011)
Midostaurin	FLT3, KDR, PDGFR, KIT, PKC	AML, MDS	(Fabbro et al., 2000)
Motesanib	VEGFR-Familie, PDGFRa, b, KIT	NSCLC	(Polverino et al., 2006)
Neratinib	ERBB1, 2	NSCLC, Mammakarzinom	(Bose and Ozer, 2009)
PF-562271	PTK2, PTK2B	-	(Roberts et al., 2008)
Quizartinib	FLT3, CSF1R, KIT, PDGFRa, b	AML	(Levis, 2014)
SAR131675	FLT4	-	(Alam et al., 2012)
Saracatinib	SRC-Familie, EGFR, ABL1, 2	AML, NSCLC, Melanom	(Hennequin et al., 2006)
Tandutinib	FLT3, KIT	Nierenzellkarzinom, AML, CML	(Griswold et al., 2004)
Tivozanib	VEGFR-Familie	Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom	(De Luca and Normanno, 2010; Jamil et al., 2015)
VS-4718	PTK2	AML, ALL, metastatische Karzinome	(Tam et al., 2014)
Vatalanib	KDR, VEGFR-Familie, KIT, PDGFRa, b	Melanom, NSCLC, kolorektales Adenokarzinom	(Wood et al., 2000)
<b>Monoklonale Antikörper</b>			
KB004	EPHA3	MDS	[23]

## 2 ZIELSETZUNG

Die akute lymphatische Leukämie des erwachsenen Alters ist eine sehr schwere Erkrankung des blutbildenden Systems, welche unbehandelt schnell zum Tode führt. Trotz intensivster und sehr nebenwirkungsreicher Therapie beträgt das 5-Jahres-Gesamtüberleben von erwachsenen Patienten mit ALL zurzeit weiterhin nur etwas über 50 %.

Tyrosinkinasen spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse. Rezeptor-Tyrosinkinasen vermitteln extrazelluläre Signale in das Zellinnere und zytoplasmatische Tyrosinkinasen sind Teil zellulärer Signalkaskaden. Ihnen kommt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellzyklus, Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben zu. Ihre Aktivität ist streng reguliert und pathologisch veränderte Aktivitätszustände, beispielsweise über Mutationen, Translokationen oder Veränderungen im Expressionsniveau, lassen sich in einer Vielzahl maligner Erkrankungen nachweisen. Ein prominentes Beispiel ist das konstitutiv aktive BCR-ABL-Fusionsprotein in 90 % aller CML- und in etwa einem Viertel der ALL-Erkrankungen. Auch Mutationen in den Tyrosinkinasen FLT3, JAK1 und JAK2 tragen zur Entstehung von Leukämien bei. Tyrosinkinasen stellen interessante therapeutische Ziele dar, da diese spezifisch inhibiert werden können und eine Vielzahl verschiedener TK-Inhibitoren bereits zum klinischen Einsatz zugelassen sind oder sich in klinischer Prüfung befinden. Eine angepasste, Patienten-spezifische Therapie ermöglicht eine Verbesserung der Chemotherapie mit im besten Fall verringerten Nebenwirkungen. Bei ALL-Patienten liefert die ABL1-Kinase in etwa einem Viertel der Fälle einen therapeutischen Angriffspunkt. Für alle anderen ALL-Patienten besteht bisher keine Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie. Daher ist die Identifikation weiterer Ziele insbesondere für BCR-ABL-negative Patienten von Bedeutung.

Bisher liegen bei adulter ALL lediglich Kenntnisse über einzelne pathologisch veränderte Tyrosinkinasen vor, eine systematische Untersuchung aller Tyrosinkinasen wurden noch nicht durchgeführt.

Das Ziel dieser Dissertation lag in der Identifikation neuer Tyrosinkinasen, welche die Pathogenese der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenenalters beeinflussen und neue therapeutische Ansatzpunkte darstellen könnten oder eine exaktere Risikostratifizierung ermöglichen. Der Einsatz spezifisch wirkender TK-Inhibitoren könnte eine an den Patienten angepasste Therapie ermöglichen und das Überleben der Patienten verbessern.

Die Ergebnisse der Untersuchungen geben einen Einblick in die Beteiligung von Tyrosinkinasen an der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung der adulten ALL und dienen als Basis für weiterführende Untersuchungen. Dazu wurden folgende Punkte untersucht:

## ZIELSETZUNG

- Expressionsveränderungen im Tyrosin-Kinom
- Einfluss der Methylierung auf die veränderten Expressionen anhand exemplarisch ausgewählter Tyrosinkinase-Gene
- funktionelle Assays zur Analyse des Einflusses einer verstärkten Expression von Tyrosinkinasen mit abnormer Expression in ALL-Zellen und deren Inhibitoren auf das Proliferationsverhalten verschiedener Leukämiezelllinien.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 *Expressionsanalyse von Tyrosinkinase-Genen*

#### 3.1.1 *TaqMan® Array Card Expressionsanalyse*

Die Expressionsanalyse von Tyrosinkinase-Genen bei adulten Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie erfolgte mittels quantitativer PCR. Dazu wurde die *TaqMan® Array Card* von Applied Biosystems (Life Technologies, Darmstadt) eingesetzt. Die mit spezifischen Primerpaaren und TaqMan-Sonden ausgestatteten Mikroreaktionsräume dieses Arrays ermöglichten eine sequenzspezifische Quantifizierung der cDNA-Mengen. Die qPCR stellt eine effiziente und etablierte Methode dar um möglichst genaue Informationen über die TK-Expression zu erhalten. Die Auswertung der quantitativen PCR erfolgte nach der DDCT-Methode (Schmittgen and Livak, 2008), siehe dazu auch Kapitel 6.4.1. Über Normalisierung mit Hilfe der Haushaltsgene *B2M* (*beta-2-microglobulin*) und *GUSB* (*beta-glucuronidase*) wurde der DCt-Wert ermittelt; die Differenz zwischen dem DCt-Wert einer Leukämieprobe und dem DCt-Mittelwert der Kontrollen ergab den DDCT-Wert. Die beiden verwendeten Haushaltsgene erwiesen sich in Untersuchungen von Beillard et al. (Beillard et al., 2003) als die von hämatopoetischen Zellen vergleichsweise am stabilsten exprimierten Gene. Durch die Verwendung zweier Haushaltsgene und deren Mittelwertbildung wurde die Problematik einer konstanten Expression minimiert. Negative DDCT-Werte entsprechen einer verstärkten Expression in ALL-Patienten, positive DDCT-Werte einer verringerten Expression. Der  $2^{-DDCT}$ -Wert gibt den genauen Expressionsunterschied wieder: erhöhte Expressionen haben  $2^{-DDCT}$ -Werte  $> 1$  und verringerte Expressionen  $2^{-DDCT}$ -Werte  $< 1$ .

Die Expressionsanalyse mittels der *TaqMan® Array Card* ergab nur geringe Abweichungen zwischen den Ct-Werten der Duplikate und die Ergebnisse waren auch bei Versuchswiederholung reproduzierbar. Die mittlere Standardabweichung für hoch exprimierte Gene war sehr gering: beispielsweise betrug die mittlere Standardabweichung für das Gen *PTK2B* 0,07 und für *B2M* 0,17 Ct-Werte. Bei sehr niedriger Expression konnte die Abweichung zwischen den Duplikaten in Einzelfällen bei bis zu drei Ct-Werten liegen, meistens lag die Standardabweichung aber bei etwa 0,5 Ct-Werten. Die Expressionsergebnisse waren auch im makro Format reproduzierbar. Dies wurde am Beispiel der Gene *NTRK3*, *FLT4* und *EPHA7* nachgewiesen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Es wurde die Expression von 54 Rezeptor-Tyrosinkinasen und 32 zytoplasmatischen Tyrosinkinasen bestimmt. Untersucht wurden mononukleäre Zellen aus Knochenmarkproben von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie und von gesunden Personen. Die TK-

Expression in hochaufgereinigten B-, T- und Stammzellen von Normalpersonen wurden ebenfalls bestimmt.

**Tabelle 3-1: Mittels *TaqMan® Array Card* untersuchte Gene**

Rezeptor-Tyrosinkinasen (54)		Zytoplasmatische Tyrosinkinasen (32)	
AATYK-Familie	AATK	ABL-Familie	ABL1, ABL2
ALK-Familie	ALK, LTK	ACK-Familie	TNK1, TNK2
AXL-Familie	AXL, MERTK, TYRO3	CSK-Familie	CSK, MATK
DDR-Familie	DDR1, DDR2	FAK-Familie	PTK2, PTK2B
EGFR-Familie	ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4	FES-Familie	FER, FES
EPH-Familie	EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB6	FRK-Familie	PTK6, FRK, SRMS
FGFR-Familie	FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4	JAK-Familie	JAK1, JAK2, JAK3, TYK2
INSR-Familie	IGF1R, INSR, INSRR, ROS1	SRC-A-Familie	FGR, FYN, SRC, YES1
MET-Familie	MET, MST1R	SRC-B-Familie	BLK, HCK, LCK, LYN
MUSK-Familie	MUSK	TEC-Familie	BMX, BTK, ITK, TEC, TXK
PDGFR-Familie	CSF1R, KIT, FLT3, PDGFRA, PDGFRB	SYK-Familie	SYK, ZAP70
PTK7-Familie	PTK7		
RET-Familie	RET		
ROR-Familie	ROR1, ROR2		
RYK-Familie	RYK		
TIE-Familie	TEK, TIE		
TRK-Familie	NTRK1, NTRK2, NTRK3		
VEGFR-Familie	FLT1, KDR, FLT4		
LMTK2	Ser/Thr/Tyr Kinase		
Haushaltsgene			
B2M, GUSB			

### 3.1.2 Patientenproben

Es wurde die TK-Expression der Leukämiezellen von 26 T-Linien und 45 B-Linien ALL-Patienten untersucht, welche im Rahmen der GMALL-Studie behandelt wurden. Dabei wurden BCR-ABL-negative Patientenproben ausgewählt, welche einen sehr hohen Blastenanteil (im Median waren 85 % der Zellen leukämische Blasten) im Knochenmark aufwiesen. So wurden die Ergebnisse der quantitativen PCR nur in geringem Umfang durch gesunde Zellen beeinflusst. Die mononukleären Lymphozyten wurden mittels Ficoll-Auftrennung aus dem Knochenmark von Leukämiepatienten isoliert. Von der RNA dieser Lymphozyten wurde pro PCR-Reaktion ein RNA-Äquivalent von 21 ng zur cDNA-Synthese eingesetzt.

Die Knochenmark-Proben wurde mittels Immunphänotypisierung, d.h. der Bestimmung von T-/NK-Zell-, B-Zell-, myeloischer und Progenitor-Antigene, dem entsprechendem Leukämie-

Subtyp zugeordnet. Zudem wurden die Patientenproben molekulargenetisch auf das Vorhandensein von ALL-AF4- und MLL-ENL-Translokationen geprüft.

Das Alter und Geschlecht der ALL-Patienten ist in Tabelle 3-2 dargestellt. Die Altersverteilung der hier untersuchten T-ALL-Patienten zeigte einen Median bei 37 Jahren, die Altersverteilung der B-ALL-Patienten wies zwei Gipfel auf, einen im jungen Alter < 26 Jahre und einen zweiten im Alter > 50.

Die Geschlechtsverteilung in der ALL zeigt eine Prävalenz bei Männern. In der T-ALL sind etwa 75 % und in der B-ALL 59 % aller Patienten männlich (Marks et al., 2009). Die hier untersuchte Stichprobe bestand in der T-ALL zu 70 % aus männlichen Patienten, in der B-ALL zu 74 %.

**Tabelle 3-2: Immunologische Subtypen, Alter und Geschlecht der untersuchten Patienten mit akuter lymphatischen Leukämie**

	B-ALL			T-ALL		
	pro B-ALL	prä B-ALL	c ALL	prä T-ALL	thym T-ALL	T-ALL
Anzahl [n]	11	13	21	8	8	10
Alter [Median/Range]	46/59			37/48		
	51/58	56/54	46/56	37/40	31/29	32/43
männlich/weiblich	33/12			18/8		
	8/3	8/5	17/4	3/5	8/0	7/3

### 3.1.3 Kontrollproben, aufgereinigte B-, T-lymphatische Zellen und Stammzellen

Die Kontrollproben wurden entsprechend der ALL-Proben über Ficoll-Auftrennung aus dem Knochenmark gesunder Spender isoliert. Die TK-Expression hochaufgereinigter B- und T-Zellen von Normalpersonen wurden zum Vergleich mit der spezifischen Expression der B- und T-Linien ALL ebenfalls bestimmt. Damit konnte eine Einordnung veränderter Expressionen im Hinblick auf die B- oder T-Linien Abstammung einer Leukämie erfolgen. Die Isolierung der T- und B-lymphatischen Zellen erfolgte mittels des MACS-Systems und CD3- bzw. CD19-Antikörpern aus der Lymphozytenfraktion.

Die TK-Expression multipotenter Stammzellen wurde in hochaufgereinigten CD34+ Zellen bestimmt. Die Stammzellen wurden mittels CD34-Antikörper aus angereicherten Leukapheresen isoliert.

**Tabelle 3-3: Alter und Geschlecht der Normalpersonen**

	Normalpersonen
Anzahl [n]	12
Alter [Median/Range]	39/57
männlich/weiblich	5/7

### 3.1.4 Expressionsanalyse des Tyrosin-Kinoms von ALL-Patienten

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse des TK-Kinoms sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst dargestellt. Dort sind die Mediane  $\bar{x}$  der DCt und  $2^{-DCt}$ -Werte der untersuchten B- und T-Linien ALLs sowie der Normalpersonen (NP), der Expressionsunterschied  $2^{-DDCt}$  und die p-Werte der Signifikanz aufgeführt. Je größer der  $2^{-DCt}$ -Wert ist, desto stärker wird das Gen in dieser Probe exprimiert. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse für alle Proben und Tyrosinkinase ist in Abbildung 9-1 des Anhangs zu finden.

**Tabelle 3-4: Ergebnisse der Expressionsanalyse des Tyrosin-Kinoms adulter ALL**

$\bar{x}$ : Median der DCt und  $2^{-DCt}$ -Werte;  $2^{-DDCt}$ : medianer Expressionsunterschied;

**Rot:** sehr stark exprimierte TK-Gene:  $2^{-DCt}$ -Werte  $\geq 5 \times 10^{-2}$  (Ct-Werte: ca. 20-29)

**Orange:** mittel stark exprimierte TK-Gene:  $2^{-DCt}$ -Werte:  $1 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-2}$  (Ct-Werte: ca. 28-32)

**Gelb:** niedrig exprimierte TK-Gene:  $2^{-DCt}$ -Werte:  $8 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$  (Ct-Werte: ca. 31-35)

**Grau:** ausgeschaltete TK-Gene:  $2^{-DCt}$ -Werte:  $1 \times 10^{-6} - 8 \times 10^{-5}$  (Ct-Werte: ca. 35-40)

**Grün:** mindestens um das 4-fache erhöht exprimiert  $2^{-DDCt} \geq 4$

**Blau:** mindestens um das 5-fache verringert exprimiert  $2^{-DDCt} \leq 0,2$

Gen	$\bar{x}$ DCt B-ALL	$\bar{x}$ $2^{-DCt}$ B-ALL	$\bar{x}$ DCt T-ALL	$\bar{x}$ $2^{-DCt}$ T-ALL	$\bar{x}$ DCt NP	$\bar{x}$ $2^{-DCt}$ NP	$2^{-DDCt}$ B-ALL	$2^{-DDCt}$ T-ALL	p-Wert B-ALL vs. NP	p-Wert T-ALL vs. NP
AATK	11.34	$3.86 \cdot 10^{-4}$	9.57	$1.31 \cdot 10^{-3}$	6.54	$1.26 \cdot 10^{-2}$	0.04	0.13	< 0.0001	< 0.0001
ABL1	3.05	$1.21 \cdot 10^{-1}$	2.41	$1.88 \cdot 10^{-1}$	5.06	$3.0 \cdot 10^{-2}$	3.91	6.06	< 0.0001	< 0.0001
ABL2	10.18	$8.62 \cdot 10^{-4}$	12.71	$1.49 \cdot 10^{-4}$	12.68	$2.06 \cdot 10^{-4}$	4.89	0.85	0.0305	0.8863
ALK	17.45	$6.00 \cdot 10^{-6}$	15.52	$2.13 \cdot 10^{-5}$	18.33	$3.0 \cdot 10^{-6}$	1.46	5.59	0.4771	0.003
AXL	12.77	$1.44 \cdot 10^{-4}$	12.0	$2.44 \cdot 10^{-4}$	8.17	$3.48 \cdot 10^{-3}$	0.04	0.08	< 0.0001	< 0.0001
BLK	2.91	$1.33 \cdot 10^{-1}$	4.88	$3.39 \cdot 10^{-2}$	7.37	$5.58 \cdot 10^{-3}$	27.15	6.94	< 0.0001	0.0048
BMX	13.7	$7.5 \cdot 10^{-5}$	12.0	$2.44 \cdot 10^{-4}$	5.17	$2.78 \cdot 10^{-2}$	0.003	0.01	< 0.0001	< 0.0001
BTk	2.35	$1.96 \cdot 10^{-1}$	4.47	$4.51 \cdot 10^{-2}$	3.67	$8.12 \cdot 10^{-2}$	2.47	0.58	< 0.0001	0.1844
CSF1R	5.39	$2.38 \cdot 10^{-2}$	6.49	$1.11 \cdot 10^{-2}$	3.91	$7.47 \cdot 10^{-2}$	0.37	0.17	0.0118	< 0.0001
CSK	8.50	$2.76 \cdot 10^{-3}$	8.67	$2.45 \cdot 10^{-3}$	11.42	$3.9 \cdot 10^{-4}$	6.03	5.38	0.001	0.0034
DDR1	3.89	$6.76 \cdot 10^{-2}$	6.98	$7.95 \cdot 10^{-3}$	8.92	$2.34 \cdot 10^{-3}$	33.01	3.88	< 0.0001	0.012
DDR2	17.53	$5.0 \cdot 10^{-6}$	17.53	$5.29 \cdot 10^{-6}$	11.45	$3.43 \cdot 10^{-4}$	0.02	0.02	< 0.0001	< 0.0001
EGFR	17.53	$5.0 \cdot 10^{-6}$	17.39	$5.82 \cdot 10^{-6}$	13.82	$7.1 \cdot 10^{-5}$	0.08	0.09	0.001	0.0009
EPHA1	11.36	$3.81 \cdot 10^{-4}$	8.52	$2.72 \cdot 10^{-3}$	8.37	$3.02 \cdot 10^{-3}$	0.15	1.09	< 0.0001	0.9721
EPHA2	12.24	$2.07 \cdot 10^{-4}$	12.16	$2.18 \cdot 10^{-4}$	9.75	$9.9 \cdot 10^{-4}$	0.17	0.18	0.0009	0.0031
EPHA3	17.38	$6.0 \cdot 10^{-6}$	17.52	$5.33 \cdot 10^{-6}$	18.58	$3.0 \cdot 10^{-6}$	1.78	1.62	0.1724	0.0383
EPHA4	8.25	$3.28 \cdot 10^{-3}$	7.19	$6.86 \cdot 10^{-3}$	6.53	$1.06 \cdot 10^{-2}$	0.27	0.57	0.0005	0.4096
EPHA5	18.98	$2.0 \cdot 10^{-6}$	17.52	$5.33 \cdot 10^{-6}$	19.54	$2.0 \cdot 10^{-6}$	1.44	3.97	0.4774	0.0013
EPHA6	18.98	$2.0 \cdot 10^{-6}$	18.03	$3.74 \cdot 10^{-6}$	18.35	$3.0 \cdot 10^{-6}$	0.64	1.25	0.2108	0.6531
EPHA7	7.73	$4.72 \cdot 10^{-3}$	17.94	$3.97 \cdot 10^{-6}$	18.93	$2.0 \cdot 10^{-6}$	2089	1.76	< 0.0001	0.0596
EPHA8	16.90	$8.0 \cdot 10^{-6}$	15.96	$1.57 \cdot 10^{-5}$	19.02	$2.0 \cdot 10^{-6}$	3.94	7.54	0.0031	0.0007
EPHB1	13.65	$7.8 \cdot 10^{-5}$	11.12	$4.49 \cdot 10^{-4}$	9.79	$1.13 \cdot 10^{-3}$	0.05	0.31	< 0.0001	0.0232
EPHB2	13.78	$7.1 \cdot 10^{-5}$	11.98	$2.48 \cdot 10^{-4}$	11.03	$4.8 \cdot 10^{-4}$	0.13	0.46	0.0009	0.0525
EPHB3	10.65	$6.23 \cdot 10^{-4}$	12.98	$1.24 \cdot 10^{-4}$	9.60	$1.32 \cdot 10^{-3}$	0.5	0.10	0.6189	< 0.0001
EPHB4	5.07	$2.98 \cdot 10^{-2}$	6.52	$1.09 \cdot 10^{-2}$	7.19	$6.83 \cdot 10^{-3}$	4.24	1.55	0.0004	0.2909
EPHB6	6.15	$1.4 \cdot 10^{-2}$	3.49	$8.91 \cdot 10^{-2}$	6.84	$9.14 \cdot 10^{-3}$	1.70	10.79	0.0456	< 0.0001
ERBB2	7.52	$5.46 \cdot 10^{-3}$	7.96	$4.01 \cdot 10^{-3}$	8.69	$2.72 \cdot 10^{-3}$	2.66	1.95	0.0055	0.0853



ERBB3	13.87	6.7 10 <sup>-5</sup>	12.94	1.27 10 <sup>-4</sup>	12.78	1.6 10 <sup>-4</sup>	0.72	1.36	0.2043	0.9353
ERBB4	18.54	3.0 10 <sup>-6</sup>	8.35	3.07 10 <sup>-3</sup>	18.46	3.0 10 <sup>-6</sup>	1.09	1278	0.9337	< 0.0001
FER	5.15	2.82 10 <sup>-2</sup>	3.89	6.76 10 <sup>-2</sup>	5.57	2.1 10 <sup>-2</sup>	1.39	3.36	0.1627	0.0159
FES	4.91	3.33 10 <sup>-2</sup>	6.56	1.06 10 <sup>-2</sup>	4.45	4.58 10 <sup>-2</sup>	0.75	0.24	0.0502	0.0015
FGFR1	4.75	3.7 10 <sup>-2</sup>	1.91	2.65 10 <sup>-1</sup>	5.42	2.34 10 <sup>-2</sup>	2.15	15.44	0.3453	< 0.0001
FGFR2	14.90	3.3 10 <sup>-5</sup>	14.76	3.62 10 <sup>-5</sup>	11.37	3.2 10 <sup>-4</sup>	0.11	0.12	0.0009	0.0027
FGFR3	12.18	2.16 10 <sup>-4</sup>	10.12	8.97 10 <sup>-4</sup>	10.37	7.58 10 <sup>-4</sup>	0.28	1.15	0.0003	0.9108
FGFR4	9.38	1.5 10 <sup>-3</sup>	9.56	1.33 10 <sup>-3</sup>	12.42	2.12 10 <sup>-4</sup>	10.19	9.02	< 0.0001	< 0.0001
FGR	6.07	1.49 10 <sup>-2</sup>	3.55	8.55 10 <sup>-2</sup>	1.03	5.1 10 <sup>-1</sup>	0.03	0.2	< 0.0001	< 0.0001
FLT1_49	8.30	3.18 10 <sup>-3</sup>	8.71	2.39 10 <sup>-3</sup>	11.87	2.26 10 <sup>-4</sup>	14.19	10.76	< 0.0001	0.0011
FLT1_61	6.03	1.53 10 <sup>-2</sup>	6.83	8.81 10 <sup>-3</sup>	10.93	4.68 10 <sup>-4</sup>	26.84	15.75	< 0.0001	< 0.0001
FLT3	1.89	2.69 10 <sup>-1</sup>	5.13	2.85 10 <sup>-2</sup>	6.14	1.32 10 <sup>-2</sup>	20.51	2.22	< 0.0001	0.0174
FLT4	5.50	2.21 10 <sup>-2</sup>	6.89	8.45 10 <sup>-3</sup>	10.51	6.85 10 <sup>-4</sup>	32.60	12.63	0.0002	0.0228
FRK	15.95	1.60 10 <sup>-5</sup>	14.72	3.71 10 <sup>-5</sup>	13.99	6.20 10 <sup>-5</sup>	0.24	0.57	0.0135	0.3921
FYN	3.93	6.55 10 <sup>-2</sup>	2.88	1.36 10 <sup>-1</sup>	3.75	7.48 10 <sup>-2</sup>	1.06	2.21	0.5023	0.0073
HCK	5.33	2.49 10 <sup>-2</sup>	5.97	1.59 10 <sup>-2</sup>	2.70	1.54 10 <sup>-1</sup>	0.17	0.11	< 0.0001	< 0.0001
IGF1R	4.17	5.55 10 <sup>-2</sup>	3.34	9.9 10 <sup>-2</sup>	3.67	7.94 10 <sup>-2</sup>	0.72	1.28	0.1297	0.6857
INSR	1.41	3.75 10 <sup>-1</sup>	3.24	1.06 10 <sup>-1</sup>	4.82	3.55 10 <sup>-2</sup>	10.35	2.93	< 0.0001	0.0059
INSRR	17.01	8.0 10 <sup>-6</sup>	14.65	3.88 10 <sup>-5</sup>	17.11	8.0 10 <sup>-6</sup>	1.26	6.73	0.7749	0.0208
ITK	7.58	5.24 10 <sup>-3</sup>	3.78	7.27 10 <sup>-2</sup>	5.04	3.07 10 <sup>-2</sup>	0.2	2.72	< 0.0001	0.0019
JAK1	1.60	3.3 10 <sup>-1</sup>	1.00	4.99 10 <sup>-1</sup>	1.98	2.52 10 <sup>-1</sup>	1.32	2.00	0.0188	< 0.0001
JAK2	4.06	6.01 10 <sup>-2</sup>	3.81	7.11 10 <sup>-2</sup>	3.33	8.87 10 <sup>-2</sup>	0.65	0.77	0.0007	0.0996
JAK3	3.76	7.38 10 <sup>-2</sup>	2.21	2.16 10 <sup>-1</sup>	4.11	6.4 10 <sup>-2</sup>	1.54	4.51	0.2712	< 0.0001
KDR	17.18	7.0 10 <sup>-6</sup>	16.41	1.15 10 <sup>-5</sup>	12.09	2.3 10 <sup>-4</sup>	0.03	0.05	0.0001	< 0.0001
KIT	9.78	1.14 10 <sup>-3</sup>	7.36	6.09 10 <sup>-3</sup>	5.53	2.17 10 <sup>-2</sup>	0.05	0.28	< 0.0001	0.0354
LCK	6.04	1.52 10 <sup>-2</sup>	0.46	7.28 10 <sup>-1</sup>	4.16	5.61 10 <sup>-2</sup>	0.46	21.82	0.0663	< 0.0001
LMTK2	5.44	2.31 10 <sup>-2</sup>	4.93	3.27 10 <sup>-2</sup>	5.73	2.0 10 <sup>-2</sup>	1.20	1.70	0.3761	0.0019
LTK	5.86	1.73 10 <sup>-2</sup>	9.48	1.4 10 <sup>-3</sup>	8.99	1.97 10 <sup>-3</sup>	8.57	0.70	< 0.0001	0.8863
LYN	2.28	2.06 10 <sup>-1</sup>	2.34	1.98 10 <sup>-1</sup>	2.11	2.36 10 <sup>-1</sup>	0.90	0.87	0.3354	0.0705
MATK	7.26	6.52 10 <sup>-3</sup>	5.92	1.65 10 <sup>-2</sup>	5.92	1.65 10 <sup>-2</sup>	0.39	1.04	0.0305	0.6738
MERTK	8.27	3.24 10 <sup>-3</sup>	5.81	1.78 10 <sup>-2</sup>	7.74	4.94 10 <sup>-3</sup>	0.71	3.92	0.1568	0.1517
MET	16.55	1.0 10 <sup>-5</sup>	15.61	2.0 10 <sup>-5</sup>	13.96	7.9 10 <sup>-5</sup>	0.15	0.29	0.0303	0.0122
MST1R	11.77	2.86 10 <sup>-4</sup>	9.99	9.84 10 <sup>-4</sup>	13.20	1.16 10 <sup>-4</sup>	2.97	10.20	0.0007	< 0.0001
MUSK	18.98	2.0 10 <sup>-6</sup>	18.12	3.51 10 <sup>-6</sup>	19.54	2.0 10 <sup>-6</sup>	1.44	2.62	0.4796	0.0172
NTRK1	11.79	2.82 10 <sup>-4</sup>	8.82	2.22 10 <sup>-3</sup>	10.61	5.99 10 <sup>-4</sup>	0.48	4.34	0.5265	0.1806
NTRK2	14.67	3.8 10 <sup>-5</sup>	16.12	1.4 10 <sup>-5</sup>	12.41	1.84 10 <sup>-4</sup>	0.2	0.07	0.0029	0.0004
NTRK3	15.92	1.6 10 <sup>-5</sup>	9.51	1.37 10 <sup>-3</sup>	15.54	2.3 10 <sup>-5</sup>	0.71	62.40	0.2489	< 0.0001
PDGFRA	13.60	8.1 10 <sup>-5</sup>	14.98	3.1 10 <sup>-5</sup>	11.64	3.14 10 <sup>-4</sup>	0.24	0.10	0.0132	0.0006
PDGFRB	6.66	9.88 10 <sup>-3</sup>	10.70	6.02 10 <sup>-4</sup>	9.95	1.01 10 <sup>-3</sup>	9.69	0.59	0.0003	0.3114
PTK2	4.01	6.19 10 <sup>-2</sup>	9.25	1.64 10 <sup>-3</sup>	6.96	8.04 10 <sup>-3</sup>	6.75	0.18	< 0.0001	0.0001
PTK2B	2.01	2.49 10 <sup>-1</sup>	2.73	1.50 10 <sup>-1</sup>	3.64	9.2 10 <sup>-2</sup>	2.83	1.71	< 0.0001	0.001
PTK6	14.05	5.9 10 <sup>-5</sup>	13.58	8.19 10 <sup>-5</sup>	12.01	2.16 10 <sup>-4</sup>	0.35	0.48	0.0273	0.0022
PTK7	4.63	4.05 10 <sup>-2</sup>	3.31	1.01 10 <sup>-1</sup>	7.84	4.7 10 <sup>-3</sup>	8.84	22.08	< 0.0001	< 0.0001
RET	14.55	4.2 10 <sup>-5</sup>	11.97	2.49 10 <sup>-4</sup>	10.35	7.71 10 <sup>-4</sup>	0.05	0.29	< 0.0001	0.0031

## ERGEBNISSE

ROR1	13.64	7.9 10 <sup>-5</sup>	11.31	3.93 10 <sup>-4</sup>	9.86	9.94 10 <sup>-4</sup>	0.06	0.31	0.0014	0.0931
ROR2	12.17	2.17 10 <sup>-4</sup>	12.23	2.09 10 <sup>-4</sup>	13.20	1.07 10 <sup>-4</sup>	2.07	2.00	0.0337	0.0976
ROS1	18.93	2.0 10 <sup>-6</sup>	15.99	1.54 10 <sup>-5</sup>	19.54	2.0 10 <sup>-6</sup>	1.50	11.45	0.3125	0.0001
RYK	6.40	1.19 10 <sup>-2</sup>	4.17	5.57 10 <sup>-2</sup>	6.06	1.51 10 <sup>-2</sup>	0.77	3.62	0.2085	< 0.0001
SRC	4.27	5.17 10 <sup>-2</sup>	4.58	4.19 10 <sup>-2</sup>	6.53	1.15 10 <sup>-2</sup>	4.57	3.73	< 0.0001	0.0015
SRMS	18.93	2.0 10 <sup>-6</sup>	18.03	3.74 10 <sup>-6</sup>	19.26	2.0 10 <sup>-6</sup>	1.34	2.50	0.6671	0.0157
SYK	6.29	1.27 10 <sup>-2</sup>	5.92	1.65 10 <sup>-2</sup>	8.39	3.09 10 <sup>-3</sup>	3.87	5.03	0.0028	0.0191
TEC	4.19	5.47 10 <sup>-2</sup>	2.76	1.48 10 <sup>-1</sup>	5.73	1.89 10 <sup>-2</sup>	2.80	7.58	< 0.0001	< 0.0001
TEK	15.03	3.0 10 <sup>-5</sup>	12.80	1.4 10 <sup>-4</sup>	11.76	2.76 10 <sup>-4</sup>	0.09	0.43	< 0.0001	0.0931
TIE1	9.65	1.24 10 <sup>-3</sup>	9.31	1.58 10 <sup>-3</sup>	9.92	1.03 10 <sup>-3</sup>	1.48	1.88	0.2157	0.2134
TNK1	11.45	3.59 10 <sup>-4</sup>	10.03	9.54 10 <sup>-4</sup>	10.46	6.82 10 <sup>-4</sup>	0.67	1.78	0.1423	0.1911
TNK2	3.40	9.51 10 <sup>-2</sup>	3.22	1.07 10 <sup>-1</sup>	3.57	8.45 10 <sup>-2</sup>	1.14	1.29	0.3867	0.5346
TXK	6.55	1.07 10 <sup>-2</sup>	4.39	4.76 10 <sup>-2</sup>	5.56	2.12 10 <sup>-2</sup>	0.70	3.12	0.3761	0.0066
TYK2	3.68	7.78 10 <sup>-2</sup>	3.13	1.15 10 <sup>-1</sup>	4.46	4.74 10 <sup>-2</sup>	1.71	2.52	0.0002	< 0.0001
TYRO3	9.88	1.06 10 <sup>-3</sup>	9.37	1.52 10 <sup>-3</sup>	12.18	2.16 10 <sup>-4</sup>	4.89	7.00	< 0.0001	< 0.0001
YES1	6.78	9.10 10 <sup>-3</sup>	3.31	1.01 10 <sup>-1</sup>	6.51	1.13 10 <sup>-2</sup>	0.84	9.35	0.8216	< 0.0001
ZAP70	4.74	3.73 10 <sup>-2</sup>	1.52	3.5 10 <sup>-1</sup>	5.44	2.85 10 <sup>-2</sup>	1.92	18.02	0.0375	< 0.0001

### 3.1.4.1 Analyse der Expressionsdaten

Die Nachweisgrenze der qPCR lag bei Ct-Werten von 35 – 40; dies entspricht 2<sup>-D<sub>Ct</sub></sup>-Werten von etwa 1 x 10<sup>-6</sup> bis 8 x 10<sup>-5</sup>. Beim Nachweis sehr geringer RNA-Mengen traten vermehrt Fehler auf, was durch größere Abweichungen zwischen den Ct-Werten der Duplikate deutlich wurde. Gene mit einer Expression in diesem Größenbereich wurden in den folgenden Analysen als nicht exprimiert betrachtet. Unterschiede bei niedriger Expression mit Ct-Werten von etwa 31 – 35 (2<sup>-D<sub>Ct</sub></sup> = 8 x 10<sup>-5</sup> – 1 x 10<sup>-3</sup>) wurden größtenteils für die weitere Analyse als nicht relevant erachtet, da in diesem Bereich Messungenauigkeiten nicht ausgeschlossen werden konnten und die biologische Relevanz oftmals zweifelhaft war. Dennoch könnten auch auf niedrigem Niveau veränderte Expressionen zur Pathogenese der Leukämie beitragen und besonders exakt in ihrer Expression kontrollierte Tyrosinkinasen könnten auch schon bei geringer Konzentration wichtige Zelleigenschaften beeinflussen. Daher wurden Expressionsunterschiede mit einer Signifikanz von p < 0,0001 trotz des relativ niedrigen Expressionslevels in die Auswertung miteinbezogen. Dies traf auf die Gene *DDR2*, *KDR*, *MST1R* und *RET* zu.

In den folgenden Analysen wurden Gene mit einer um mindestens das 4-fache erhöhten Expression (2<sup>-D<sub>D<sub>Ct</sub></sub></sup> ≥ 4) als relevant überexprimiert erachtet und TK-Gene mit einer um das mindestens 5-fache reduzierten Expression (2<sup>-D<sub>D<sub>Ct</sub></sub></sup> ≤ 0,2) als verringert exprimiert. Ist die Expression eines TK-Gens sehr stark (2<sup>-D<sub>Ct</sub></sup> = 5 x 10<sup>-2</sup> – 10<sup>0</sup>), sind auch geringere Unterschiede noch aussagekräftig. Diese Grenzwerte wurden nach einem *Cut-Off*-Prinzip festgelegt, um aus der Vielzahl der Ergebnisse die relevanten Veränderungen herauszufiltern.

Bei einigen Genen waren Abweichungen der Tyrosinkinase-Expression auf die B- oder T-Zell-Linien Abstammung der Leukämiezellen zurückzuführen. In Normalpersonen liegt der Anteil der CD3+ T-Zellen an den mononukleären Zellen des Knochenmarks zwischen 32 - 59 % und der von CD19+ B-Zellen zwischen 4 – 25 % [4]. Damit ist der Anteil der T-Zellen in der Fraktion der mononukleären Zellen in den Kontrollen sehr viel höher als die der B-Zellen und die Expressionsanalyse der mononukleären Zellen der Normalpersonen entspricht somit zu einem größeren Teil der Expression der T-Zellen. In den Knochenmarkproben der untersuchten Leukämiepatienten hingegen sind nahezu alle gesunden Zellen von den Leukämiezellen verdrängt. Der Einfluss der B- oder T-Linien Abstammung einer Leukämie auf die TK-Expression wurde mithilfe der Expressionsbestimmung in gesunden, aufgereinigten CD19+ und CD3+ Zellen beurteilt. Dabei zeigten sich teilweise sehr deutliche Expressionsunterschiede zwischen B-lymphatischen und T-lymphatischen Zellen. So war beispielsweise das Gen für *AXL* in CD3+ T-Zellen exprimiert, in CD19+ B-Zellen hingegen nicht. In Normalpersonen ergibt sich bei einem etwa 3-mal so hohem Anteil von T-Zellen durchschnittlich eine hohe Expression dieses Gens. Das TK-Expressionsprofil von CD34+ Stammzellen, CD3+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen ist in Kapitel 0 beschrieben.

Im weiteren wird zunächst auf die Tyrosinkinase-Expression gesunder Lymphozyten eingegangen, anschließend wird die Expression in akut lymphatischen Leukämiezellen beschrieben. In Kapitel 3.1.6 werden TK-Gene, welche sowohl in B- als auch T-ALL sehr hoch exprimierten, signifikant erhöht oder verringert exprimiert waren, aufgeführt. In Kapitel 3.1.7 und 3.1.8 werden die spezifischen Expressionsmuster in B- bzw. T-ALL dargestellt. Neben den Genen, welche in einem Großteil der ALL-Proben abweichende Expressionswerte aufwiesen, werden in Kapitel 3.1.7.1 und 3.1.8.1 Gene mit differenzierenden Expressionsmuster betrachtet und auf Übereinstimmung zwischen Höhe der Expression und Ausprägung patientenspezifischer Merkmale, wie dem immunologischen Subtyp, Alter oder Geschlecht, hin untersucht.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse der quantitativen PCR erfolgte über Auftragung der  $2^{-\text{DCt}}$ -Werte der Leukämieproben (rot) im Vergleich zu den  $2^{-\text{DCt}}$ -Werten der Kontrollproben (blau) mittels der *GraphPad Prism 6* Software. Dabei sind Leukämieproben nach B-Linien und T-Linien ALL unterteilt, zusätzlich ist der Median und die Signifikanz abgebildet. Zudem sind die Expressionswerte CD19+, CD3+ und CD34+ Zellen gesunder Knochenmarkproben dargestellt. Die statistische Signifikanz der abweichenden Expressionsmuster wurde über einen zweiseitigen Mann-Whitney Test berechnet und ist wie folgt gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  und ns = nicht signifikant.

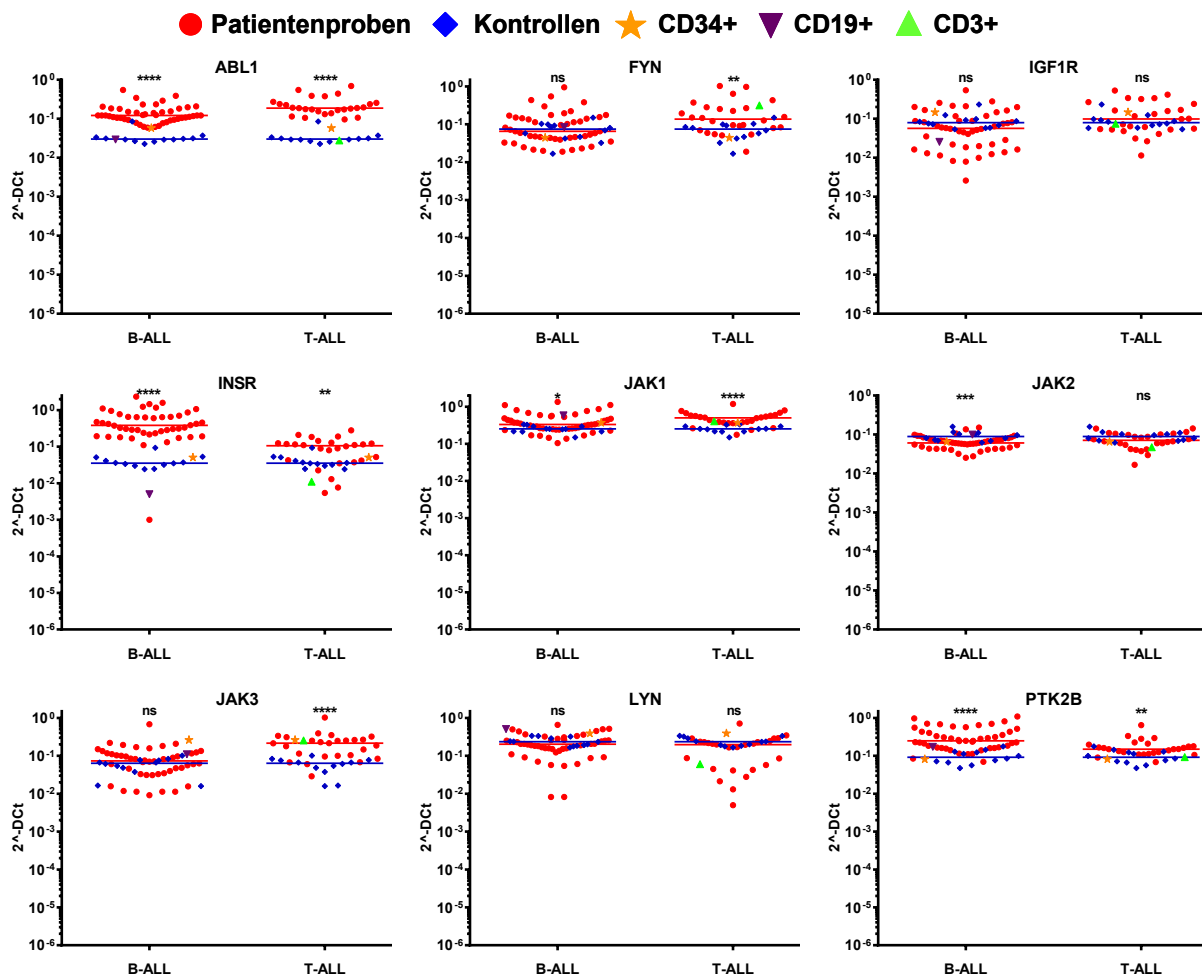
### 3.1.5 Tyrosinkinase-Expression gesunder Lymphozyten

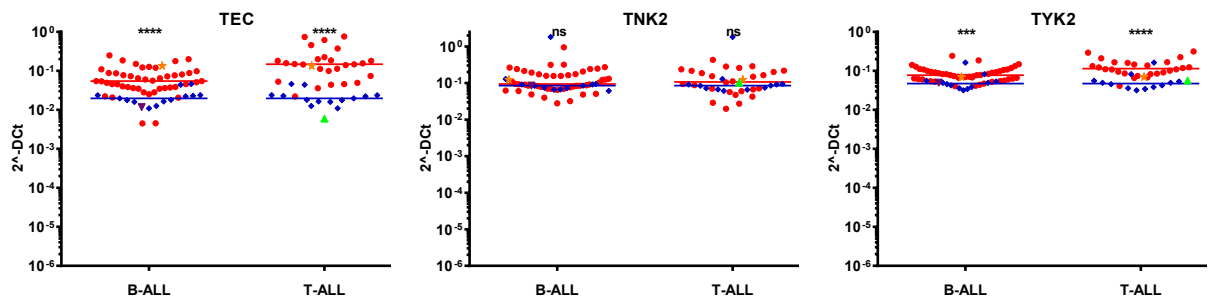
In gesunden lymphatischen Zellen und in den untersuchten Leukämiezellen waren insbesondere viele zytoplasmatischen Tyrosinkinasen sehr stark exprimiert. In gesunden Lymphozyten waren die Janus-Kinasen *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, viele SRC-Kinasen (*FGR*, *FYN*, *HCK*, *LCK*, *LYN*) sowie *BTK*, *CSF1R*, *IGF1R*, *PTK2B* und *TNK2* mit  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Werten  $\geq 5 \times 10^{-2}$  sehr hoch exprimiert.

Sehr gering exprimiert oder ausgeschaltet mit  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Werten  $< 8 \times 10^{-5}$  waren die Tyrosinkinase-Gene *ALK*, *EGFR*, *EPHA3*, *EPHA5*, *EPHA6*, *EPHA7*, *EPHA8*, *ERBB4*, *FRK*, *INSRR*, *MET*, *MUSK*, *NTRK3*, *ROS1* und *SRMS*. Mit Ausnahme der TK *EPHA7* in B-ALL und *ERBB4* und *NTRK3* in T-ALL waren diese in den meisten ALL-Proben ebenfalls kaum exprimiert.

### 3.1.6 Tyrosinkinase-Expression akuter B- und T-lymphatischer Leukämien

Unabhängig von der lymphatischen Abstammung waren sowohl in der T- als auch in der B-Linien-ALL die Expression folgender Tyrosinkinase-Gene sehr hoch ( $2^{-\Delta\text{Ct}} \geq 5 \times 10^{-2}$ ): neben den für gesunde lymphatische Zellen bereits beschriebene typische hohe Expression von *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *FYN*, *LYN*, *IGF1R*, *PTK2B* und *TNK2* wiesen spezifisch in der ALL die Kinasen *ABL1*, *INSR*, *TEC* und *TYK2* ebenfalls eine sehr hohe Expression auf.





**Abbildung 3-1: Hoch exprimierte Tyrosinkinasen in akuter B- und T-lymphatischer Leukämie (mittlere  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert  $\geq 5 \times 10^{-2}$ )**

Die Analyse der Expression erfolgte mittels der *TaqMan® Array Card* (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte von **CD19+**, **CD34+** und **CD3+** Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-\Delta C_t \text{ ALL}} / 2^{-\Delta C_t \text{ NP}}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant

\*  $p < 0,05$

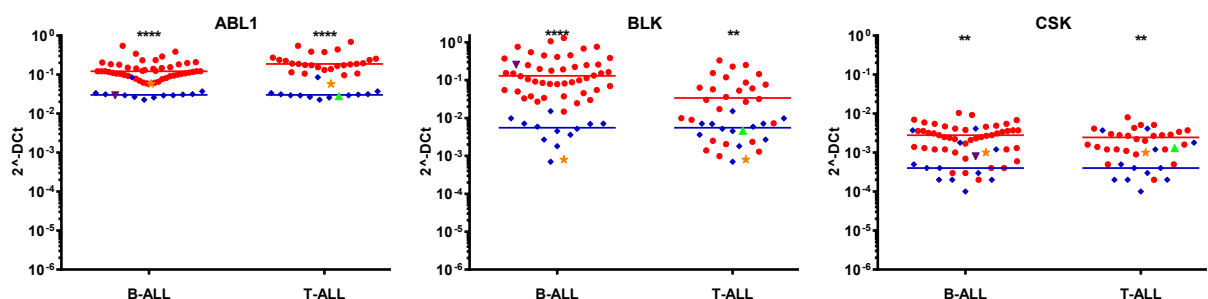
\*\*  $p < 0,01$

\*\*\*  $p < 0,001$

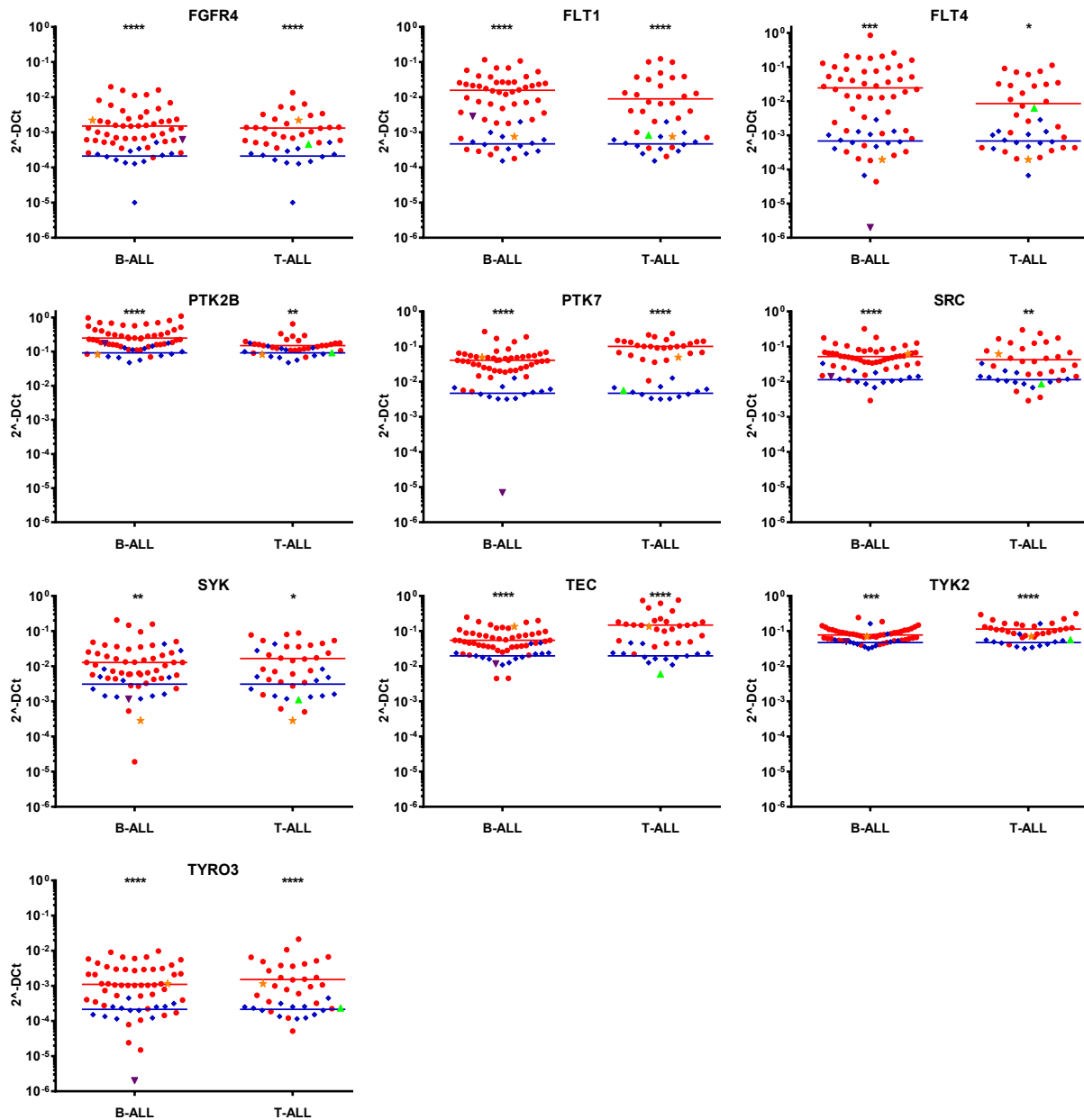
\*\*\*\*  $p < 0,0001$

Die Mehrzahl der Tyrosinkinasen wies in ALL-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant veränderte Expression auf. Eine starke **Erhöhung der Expression** in der akuten lymphatischen Leukämie der B- als auch T-Zellreihe um durchschnittlich mindestens das 4-fache ( $2^{-\Delta\Delta C_t} \geq 4$ ) zeigten die Tyrosinkinase-Gene *ABL1*, *BLK*, *CSK*, *FGFR4*, *FLT1*, *FLT4*, *PTK7*, *SRC*, *SYK*, *TEC* und *TYRO3*. Das *FLT1*-Gen lag in der B-ALL im Mittel um das 23-fache und in der T-ALL um das 12-fache erhöht vor; *FLT4* war um das 32-/11-fache; *CSK* um das 6-/5-fache; *FGFR4* um das 10-/9-fache und *TYRO3* um das 5-/7-fache verstärkt exprimiert in B-/T-ALL. Die schon in Normalpersonen sehr hoch exprimierten TK *ABL1*, *BLK*, *PTK7*, *PTK2B*, *SRC* und *TYK2* wurden von ALL-Patienten nochmals verstärkt exprimiert. Die *ABL1*-Expression war in der B-ALL um 4-fache und in der T-ALL um das 6-fache erhöht. *BLK* zeigte eine 27-/7-fache, *PTK7* eine 9-/21-fache; *SRC* eine 5-/4-fache; *TEC* eine 3-/8-fache Überexpression in B-/T-ALL. *PTK2B* und *TYK2* zeigten eine Verdopplung der Expression.

● Patientenproben ◆ Kontrollen ★ CD34+ ▼ CD19+ ▲ CD3+



## ERGEBNISSE



**Abbildung 3-2: Verstärkt exprimierte Tyrosinkinase in akuter B- und T-lymphatischer Leukämie (mittlerer  $2^{-\text{DDCt}}$ -Wert  $\geq 4$ , bei hohem Expressionsniveau  $2^{-\text{DDCt}} \geq 2$ )**

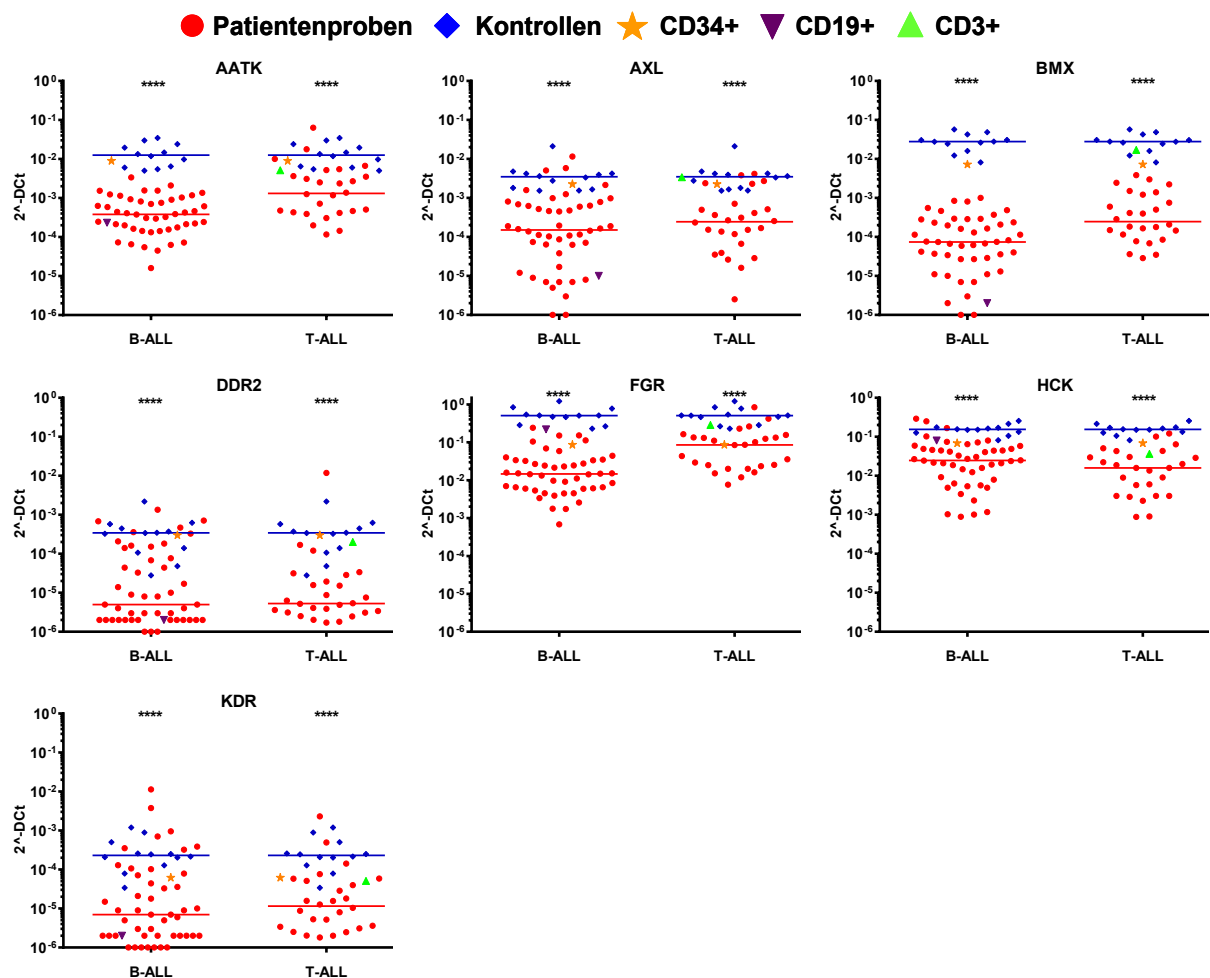
Die Analyse der Expression erfolgte mittels der *TaqMan® Array Card* (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-\text{Dct}}$ -Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind  $2^{-\text{Dct}}$ -Werte von **CD19+**, **CD3+** und **CD34+** Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-\text{DDCt}} = 2^{-\text{Dct ALL}} / 2^{-\text{Dct NP}}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Die Expression der Gene *CSK* und *FLT4* in gesunden CD3+ T-Zellen entsprach dem Expressions-Niveau der T-ALL-Proben, die erhöhte Expression dieser beruht dementsprechend wahrscheinlich auf der T-Zellabstammung der Leukämie. Die Expression von *ABL1*, *FGFR4*, *FLT1*, *PTK7*, *SRC*, *SYK* und *TYRO3* gesunder T-Zellen war vergleichbar mit der Expression dieser in Normalpersonen, folglich ist die Expressionsveränderungen kennzeichnend für die Leukämie.

In CD19+ B-Zellen war die BLK-Expression ähnlich hoch wie in den B-ALL-Proben. Die Expression der übrigen Gene war entweder geringer oder entsprach dem der Kontrollproben und die erhöhte Expression ist nicht auf die B-Zellabstammung zurückzuführen.

Neben der für gesunde lymphatische Zellen bereits beschriebenen geringen Expression von *ALK*, *EGFR*, *EPHA5*, *EPHA6*, *EPHA8*, *FRK*, *INSRR*, *MET*, *MUSK*, *ROS1* und *SRMS* wiesen spezifisch in ALL-Zellen die Kinasen *DDR2*, *FGFR2*, *KDR* und *NTRK2* ebenfalls  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte  $< 8 \times 10^{-5}$  auf.

Eine deutliche **Verringerung der Expression** um mindestens das 5-fache ( $2^{-\Delta\Delta Ct} \leq 0,2$ ) in beiden ALL-Subtypen zeigen die Gene *AATK*, *AXL*, *BMX*, *DDR2*, *FGR*, *HCK* und *KDR*.



**Abbildung 3-3: Verringert exprimierte Tyrosinkinase in akuter B- und T-lymphatischer Leukämie (mittlerer  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert  $\leq 0,2$ )**

Die Analyse der Expression erfolgte mittels der *TaqMan® Array Card* (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte von CD19+, CD3+ und CD34+ Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct \text{ ALL}} / 2^{-\Delta Ct \text{ NP}}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant

\* p < 0,05      \*\* p < 0,01      \*\*\* p < 0,001      \*\*\*\* p < 0,0001

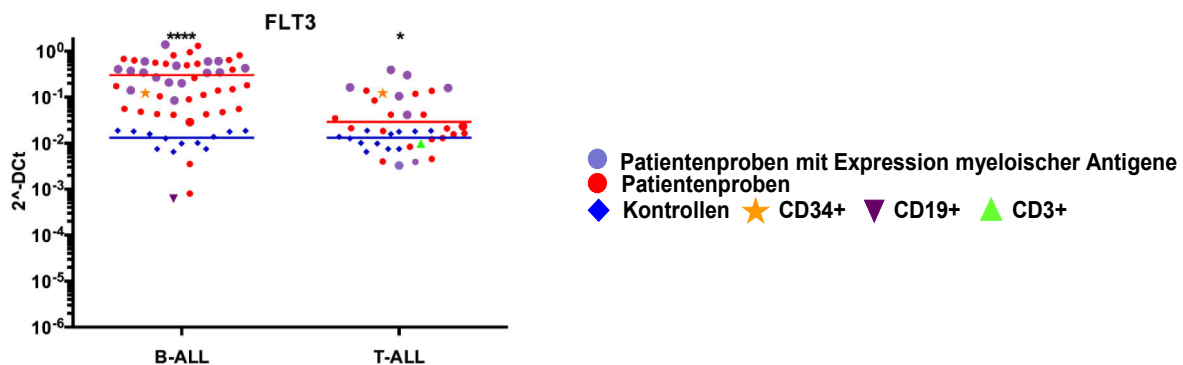
Die stärkste Reduktion der Expression war im *BMX*-Gen festzustellen, welches in der B-ALL durchschnittlich um über das 330-fache und in der T-ALL um das 100-fache verringert



exprimiert wurde. Die *DDR2*- und *KDR*-Gene zeigten in Normalpersonen eine relativ niedrige Expression und waren in einem großen Teil der ALL-Proben komplett ausgeschaltet. Die von gesunden Lymphozyten sehr stark exprimierte Gene *FGR* und *HCK* lagen in der B-ALL um das 33- bzw. 5-fache und in der T-ALL um das 50- bzw. 9-fache reduziert vor. *AXL* war in der B-ALL um das 25-fache, in der T-ALL um das 13-fache und *AATK* um das 25- bzw. 8-fache niedriger exprimiert.

Auf die B-Zelldifferenzierung kann die verringerte Expression der Gene *AATK*, *BMX*, *DDR2* und *KDR* in B-ALL zurückgeführt werden, da diese auch in gesunden B-lymphatischen Zellen ausgeschaltet bzw. gering exprimiert vorlagen. In T-Lymphozyten zeigten diese Gene eine höhere Expression als die T-ALL-Proben. *FGR* und *HCK* wurden von gesunden Zellen B- und T-lymphatischer Abstammung stärker exprimiert als von leukämischen Zellen.

### 3.1.6.1 ALL-Proben mit Expression myeloischer Antigene



**Abbildung 3-4: FLT3-Expression von ALL-Proben mit Expression myeloischer Antigene**

Ein Teil der akut lymphatischen Leukämieproben zeigte bei der Immunphänotypisierung eine aberrante Expression myeloischer Marker, die mit einer verstärkte *FLT3*-Expression assoziiert waren. *FLT3* war in T- und B-ALL-Proben mit Expression myeloischer Marker durchschnittlich um das 3,3-/2,7-fache gegenüber T-/B-ALL-Proben ohne Expression myeloischer Antigene erhöht.

### 3.1.7 Tyrosinkinase-Expression akuter B-lymphatischer Leukämien

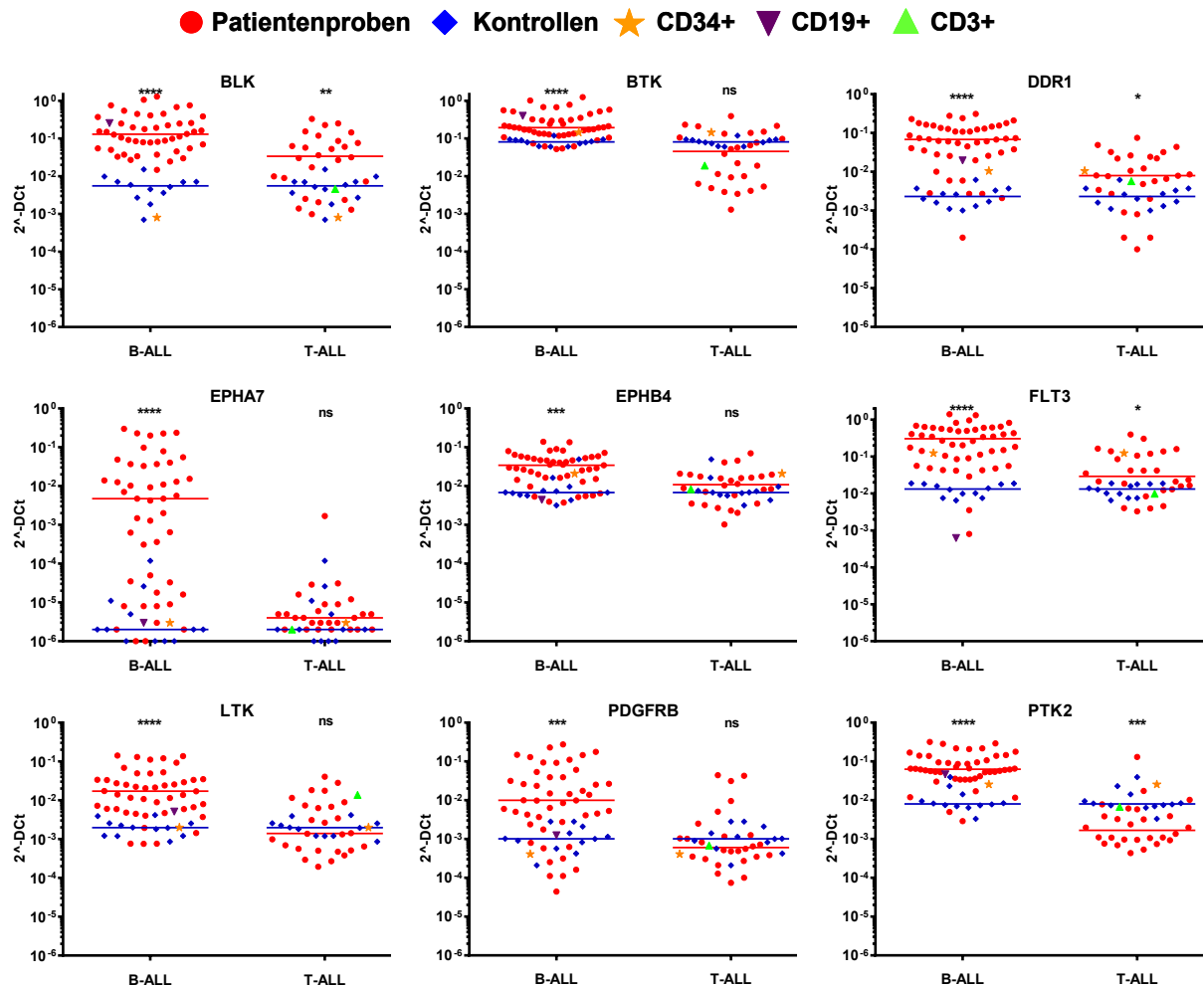
Eine sehr hohe Expression mit  $2^{-\Delta C_t}$ -Werten  $\geq 5 \times 10^{-2}$  wiesen kennzeichnend für die B-ALL die Gene *BLK*, *BTK*, *DDR1*, *FLT3* und *PTK2* auf. B-Zell spezifisch in gesunden CD19+ Zellen und in B-lymphatischen Leukämien war die Expression der *BLK*-, *BTK*- und *PTK2*-Gene stark ausgeprägt.

Besonders stark **überexprimiert** in der B-ALL waren das ohnehin hoch exprimierte Gen *DDR1* (um durchschnittlich das 33-fache) und *EPHA7* (um das 2089-fache). Der sehr große Expressionsunterschied des *EPHA7*-Gens beruht auf der Ausschaltung dieses Gens in Normalpersonen. Die Gene *LTK* und *PDGFRB* wurden um das 9- bzw. 10-fache



überexprimiert. Die auch von gesunden Lymphozyten hoch exprimierten Gene *BTK*, *DDR1*, *EPHB4*, *FLT3*, *INSR* und *PTK2* waren in den leukämischen B-Zellen nochmals stärker exprimiert. *BTK* zeigte eine um das durchschnittlich 2,5-fache, *EPHB4* eine 4-fache, *FLT3* eine 21-fache und *PTK2* eine um das 7-fache erhöhte Expression.

*FLT3*, *EPHA7*, *EPHB4* und *PDGFRB* lagen in gesunden B-Lymphozyten nur gering exprimiert vor, deren Überexpression war kennzeichnend für die B-Linien Leukämie. *BTK* und *DDR1* wurde von CD19+ Zellen und B-ALL-Zellen ähnlich stark exprimiert, die Expressionserhöhung steht hier also im Zusammenhang mit der B-Zellabstammung der Leukämie.



**Abbildung 3-5: Verstärkt exprimierte Tyrosinkinasen in akuter B-lymphatischer Leukämie (mittlerer  $2^{-DDCt}$ -Wert  $\geq 4$ , bei hohem Expressionsniveau  $2^{-DDCt} \geq 2$ )**

Die Analyse der Expression erfolgte mittels der *TaqMan® Array Card* (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-DDCt}$ -Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind  $2^{-DDCt}$ -Werte von CD19+, CD3+ und CD34+ Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-DDCt} = 2^{-DDCt} \text{ ALL} / 2^{-DDCt} \text{ NP}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant

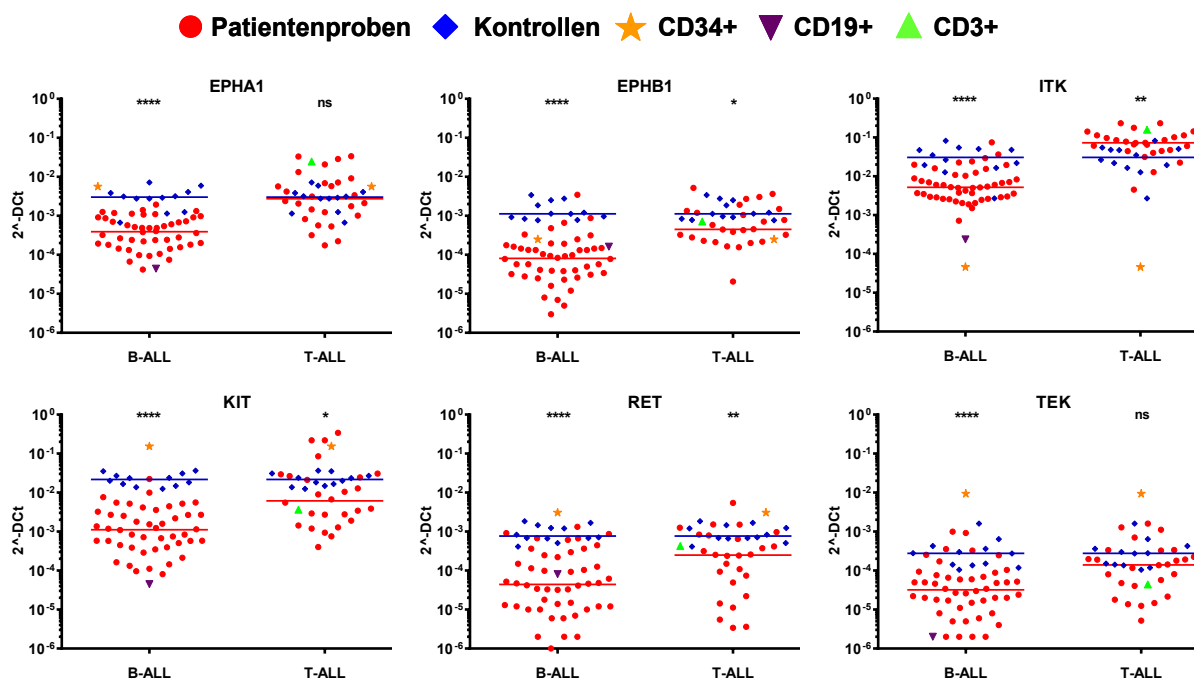
\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

\*\*\*  $p < 0,001$

\*\*\*\*  $p < 0,0001$

In der B-ALL um mindestens das 5-fache **verringert exprimiert** waren die TK-Gene *EPHA1*, *EPHB1*, *ITK*, *KIT*, *RET* und *TEK*. Die verringerte Expression dieser Gene konnte auf die B-lymphatische Abstammung zurückgeführt werden, da diese in CD19+ B-Zellen nicht oder nur gering exprimiert wurden.

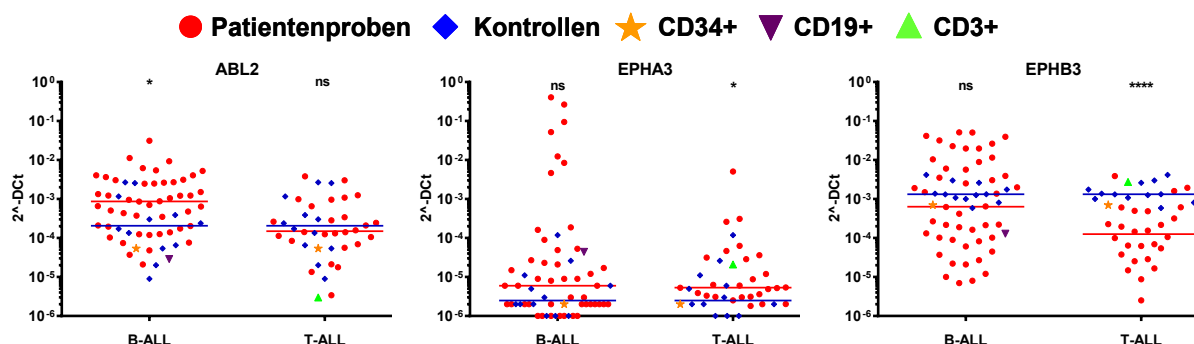


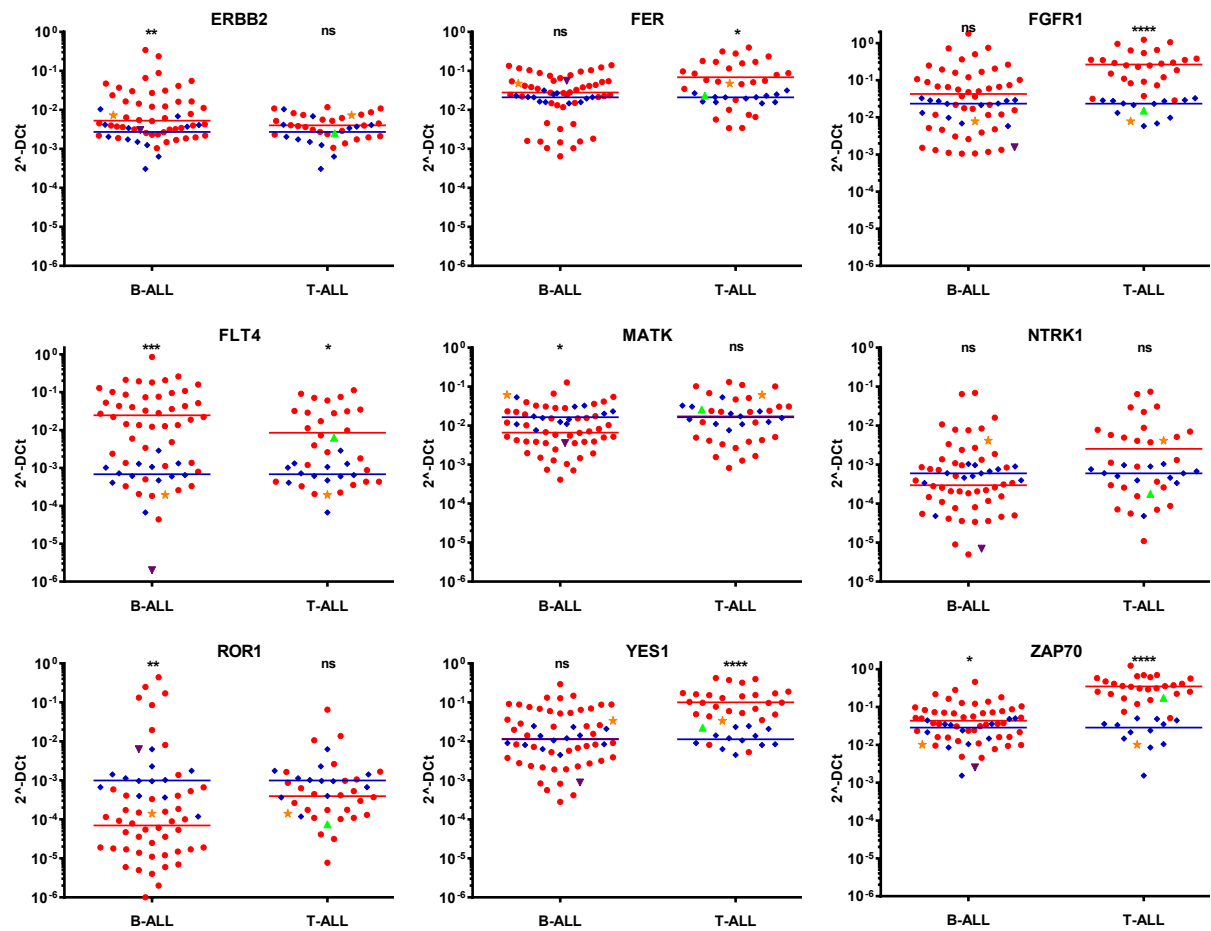
**Abbildung 3-6: Verringert exprimierte Tyrosinkinasen in akuter B-lymphatischer Leukämie (mittlerer  $2^{-DDCt}$ -Wert  $\leq 0,2$ )**

Die Analyse der Expression erfolgte mittels der *TaqMan® Array Card* (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-DDCt}$ -Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind  $2^{-DDCt}$ -Werte von CD19+, CD3+ und CD34+ Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-DDCt} = 2^{-DDCt} \text{ ALL} / 2^{-DDCt} \text{ NP}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.1.7.1 Differierende Expressionsmuster der B-ALL

Neben den Tyrosinkinase-Genen, welche im Großteil der Proben veränderte Expressionswerte aufwiesen, zeigten einige TK stark unterschiedliche Expressionen zwischen den verschiedenen ALL-Patienten. Anhand dieser differierenden Expressionslevel wurden die Proben in Subgruppen eingeteilt und mit Alter, Geschlecht, immunologischen Subtyp und der Expression immunologischer Marker verglichen. Eine Zusammenfassung dieser Daten im Bezug zum Expressionsniveau ist Tabelle 3-5 zu entnehmen.





**Abbildung 3-7: Tyrosinkinasen mit variierender Expression in akuter B-lymphatischer Leukämie**

Die Analyse der Expression erfolgte mittels der *TaqMan® Array Card* (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-DDCt}$ -Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind  $2^{-DDCt}$ -Werte von **CD19+**, **CD34+** und **CD34+** Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-DDCt} = 2^{-DDCt} \text{ ALL} / 2^{-DDCt} \text{ NP}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant  
\*  $p < 0,05$       \*\*  $p < 0,01$       \*\*\*  $p < 0,001$       \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Eine besonders auffällige Subgruppe bildeten sechs B-Linien ALLs, welche **EPHA3** exprimierten, während dieses Gen in allen anderen Patienten ausgeschaltet vorlag. Bei drei der Proben handelte es sich um prä B-ALLs, es konnten keine Übereinstimmungen zwischen Höhe der **EPHA3**-Expression und Geschlecht, Alter oder Oberflächenmarker festgestellt werden. Die **ROR1**-Expression war in den meisten Proben verringert, sieben B-Linien ALLs exprimierten **ROR1** hingegen verstärkt. Von diesen wiesen fünf die Merkmale einer prä B-ALL auf. Darüber hinaus war die fehlende CD34-Expression in sechs dieser sieben Patienten auffällig, da eine starke CD34-Expression in 88 % der restlichen B-ALL Proben festzustellen war. Die Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase **FGFR1** war in 14 Patienten um mindestens das 5-fache erhöht und in neun Patienten um mindestens das 5-fache verringert. Die B-ALL Patienten mit niedriger **FGFR1**-Expression waren fast ausschließlich männlich (8/9) und 6 der 9 Proben zeigten die Expression des myeloischen Antigens CD33. Auch das Alter scheint mit der **FGFR1**-Expression zu korrelieren, im Durchschnitt waren Patienten mit Überexpression

von *FGFR1* 57 und mit verringerter Expression 26 Jahre alt. Die **ZAP70**- und **EPHB3**-Expression variierte sehr stark zwischen den verschiedenen B-ALL Proben. Dabei scheint die Expression mit dem Reifegrad der ALL assoziiert zu sein. Eine mindestens verdoppelte **ZAP70**-Expression konnte in 51 % der untersuchten B-ALLs festgestellt werden, wobei die Expression sich zwischen dem 2- bis 24-fachen variierte. 69 % der prä B-ALL-Proben, 48 % der common ALLs und nur 35 % der pro B-ALL-Proben zeigten mindestens eine verdoppelte Expression. **EPHB3** wurde ebenfalls insbesondere von reiferen ALL-Zellen vermehrt exprimiert. 69 % der prä B-ALLs und nur 28 % der pro B und common ALLs wiesen eine erhöhte **EPHB3**-Expression auf. Eine Überexpression von **FER** wurde ausschließlich in männliche Patienten festgestellt. Auch die **ERBB2**-Überexpression zeigte eine Prävalenz männlicher Patienten (11/13). Eine um mindestens das 4-fache verringerte **MATK**-Expression wiesen überwiegend männliche Patienten auf (47 % der männlichen, 16 % der weiblichen Patienten). Die Höhe der **ABL2**, **FLT4**, **NTRK1** und **YES1**-Expression in der B-Linien ALL konnte mit keinem immunologischen Subtyp, Marker, Geschlecht oder Alter assoziiert werden.

**Tabelle 3-5: Variierende TK-Expression in B-ALL Patienten**

ALL-Subtypen, Alter- und Geschlechtsverteilung (m/w = männlich/weiblich; [n] = Anzahl)

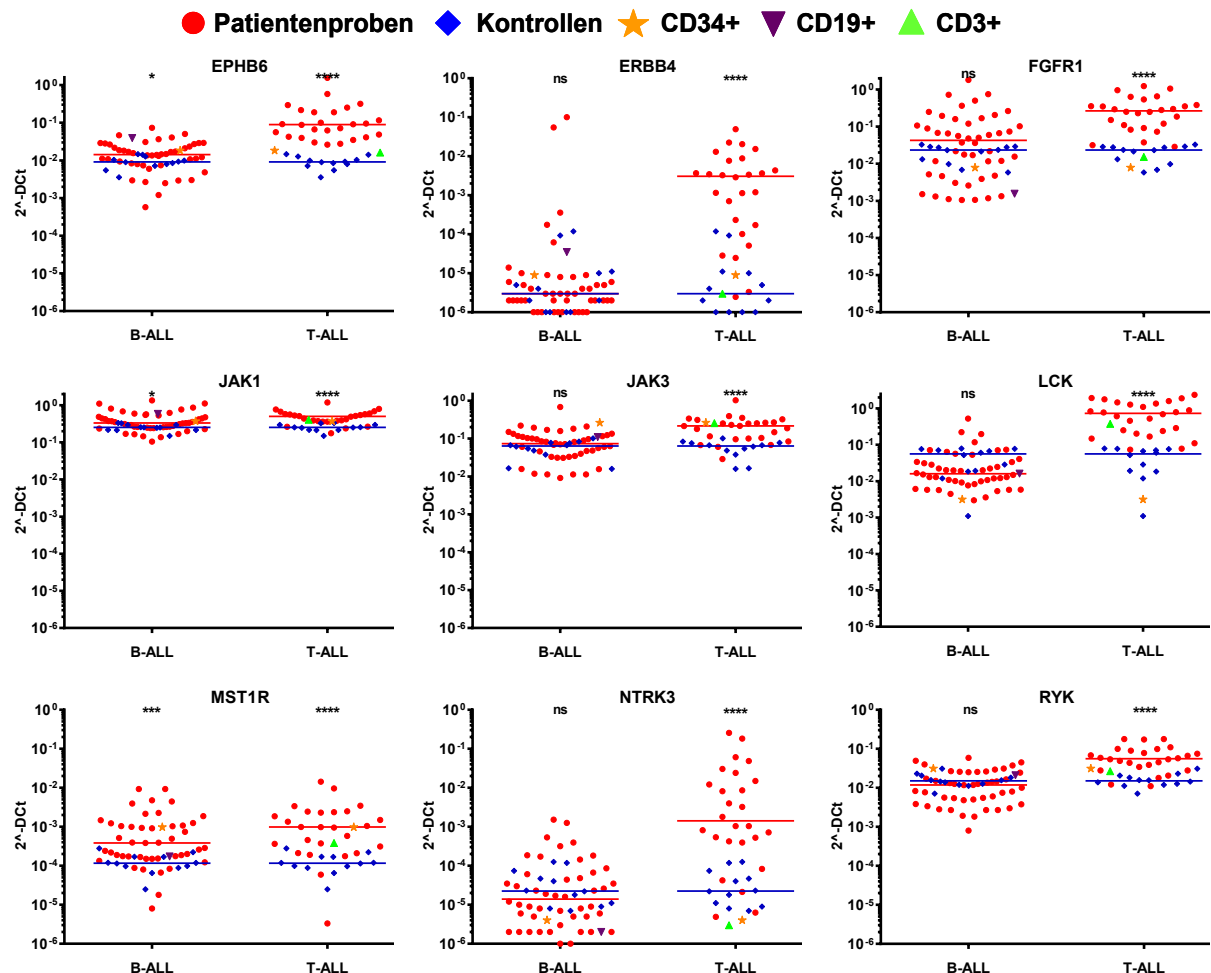
Gen	Expression	m/w [33/12]	Alter (Median)	pro B-ALL [11]	c ALL [21]	prä B-ALL [13]
ABL2	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	23/7	51	9	14	7
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	7/3	32	2	4	4
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	3/2	38	0	3	2
EPHA3	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	4/2	47	1	2	3
EPHB3	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	12/6	55	3	6	9
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	2/3	57	1	2	2
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	19/3	39	7	13	2
ERBB2	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	18/8	57	4	12	10
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	5/3	52	7	9	3
FER	erhöht ( $2^{-DDCt} > 4$ )	10/0	45	1	6	2
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	24/12	54	7	18	9
FGFR1	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	14/3	57	2	10	9
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	5/3	34	3	3	2
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	11/2	26	4	7	2
FLT4	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	25/10	44	9	16	10
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	5/1	51	2	3	1
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	3/1	54	0	2	2
MATK	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	4/2	58	2	2	2
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	9/6	38	3	5	7
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	20/6	43	6	14	6
NTRK1	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	9/4	50	4	6	3
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	6/4	58	4	1	5
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	18/4	39	3	14	5

ROR1	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	3/4	56	0	2	5
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	18/8	45	11	18	7
YES 1	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	16/4	43	5	11	4
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	5/2	47	3	1	6
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	9/7	44	3	9	4
ZAP70	erhöht ( $2^{-DDCt} > 5$ )	6/4	57	2	4	5
	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	8/2	46	6	7	8
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	12/5	42	6	6	4
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	4/1	36	1	4	0

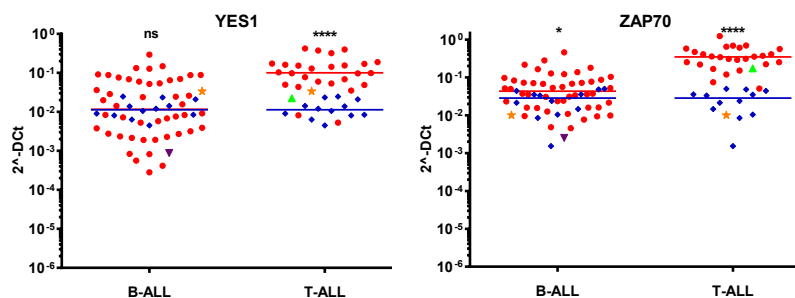
### 3.1.8 Tyrosinkinase-Expression akuter T-lymphatischer Leukämien

Neben den bereits beschriebenen hoch exprimierten Genen *ABL1*, *FYN*, *LYN*, *IGF1R*, *INSR*, *JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *PTK2B*, *TEC*, *TNK2* und *TYK2* waren spezifisch in der T-Linien ALL mit einem DCt-Wert  $\geq 5 \times 10^{-2}$  folgende Tyrosinkinasen sehr stark exprimiert: *EPHB6*, *FER*, *FGFR1*, *ITK*, *LCK*, *PTK7*, *RYK*, *YES1* und *ZAP70*.

In der T-Linien ALL **überexprimiert** um mindestens das 4-fache waren die Tyrosinkinasen *EPHB6*, *ERBB4*, *FGFR1*, *JAK3*, *LCK*, *MST1R*, *NTRK3*, *YES1* und *ZAP70*.



## ERGEBNISSE



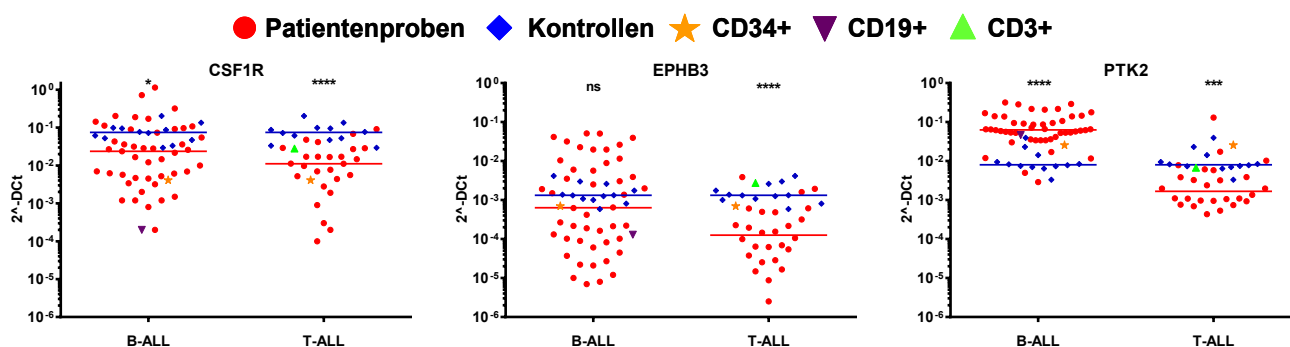
**Abbildung 3-8: Verstärkt exprimierte Tyrosinkinasen in akuter T-lymphatischer Leukämie (mittlere  $2^{-DDCt}$ -Wert  $\geq 4$ , bei hohem Expressionsniveau  $2^{-DDCt} \geq 2$ )**

Die Analyse der Expression erfolgte mittels der *TaqMan® Array Card* (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-DDCt}$ -Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind  $2^{-DDCt}$ -Werte von **CD19+**, **CD3+** und **CD34+** Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-DDCt} = 2^{-DDCt} \text{ ALL} / 2^{-DDCt} \text{ NP}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant  
\*  $p < 0,05$       \*\*  $p < 0,01$       \*\*\*  $p < 0,001$       \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Besonders stark überexprimiert waren die Gene *ERBB4* und *NTRK3* um durchschnittlich das 1278- und 62-fache. Die schon in gesunden Lymphozyten sehr hoch exprimierten Gene *EPHB6* (9-fach), *FGFR1* (15-fach), *JAK1* (2-fach), *JAK3* (4,5-fach) *LCK* (22-fach), *MST1R* (10-fach), *YES1* (9-fach) und *ZAP70* (18-fach) waren charakteristisch in den T-lymphatischen Leukämiezellen nochmals verstärkt exprimiert.

Dabei war in den CD3+ T-Lymphozyten die Expression der Gene *EPHB6*, *ERBB4*, *FGFR1*, *MST1R*, *NTRK3* und *YES1* vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe, die erhöhte Expression war dementsprechend charakteristisch für die T-ALL. *JAK1*, *JAK3*, *LCK* und *ZAP70* zeigten in den aufgereinigten, gesunden T-Zellen eine ähnlich hohe Expression wie in den leukämischen T-Zellen.

Spezifisch in der T-ALL um mindestens das 5-fache **verringert** exprimiert waren die Gene *CSF1R*, *EPHB3* und *PTK2*. In CD3+ Zellen war die Expression von *CSF1R*, *EPHB3* und *PTK2* auf dem Niveau der Normalpersonen.

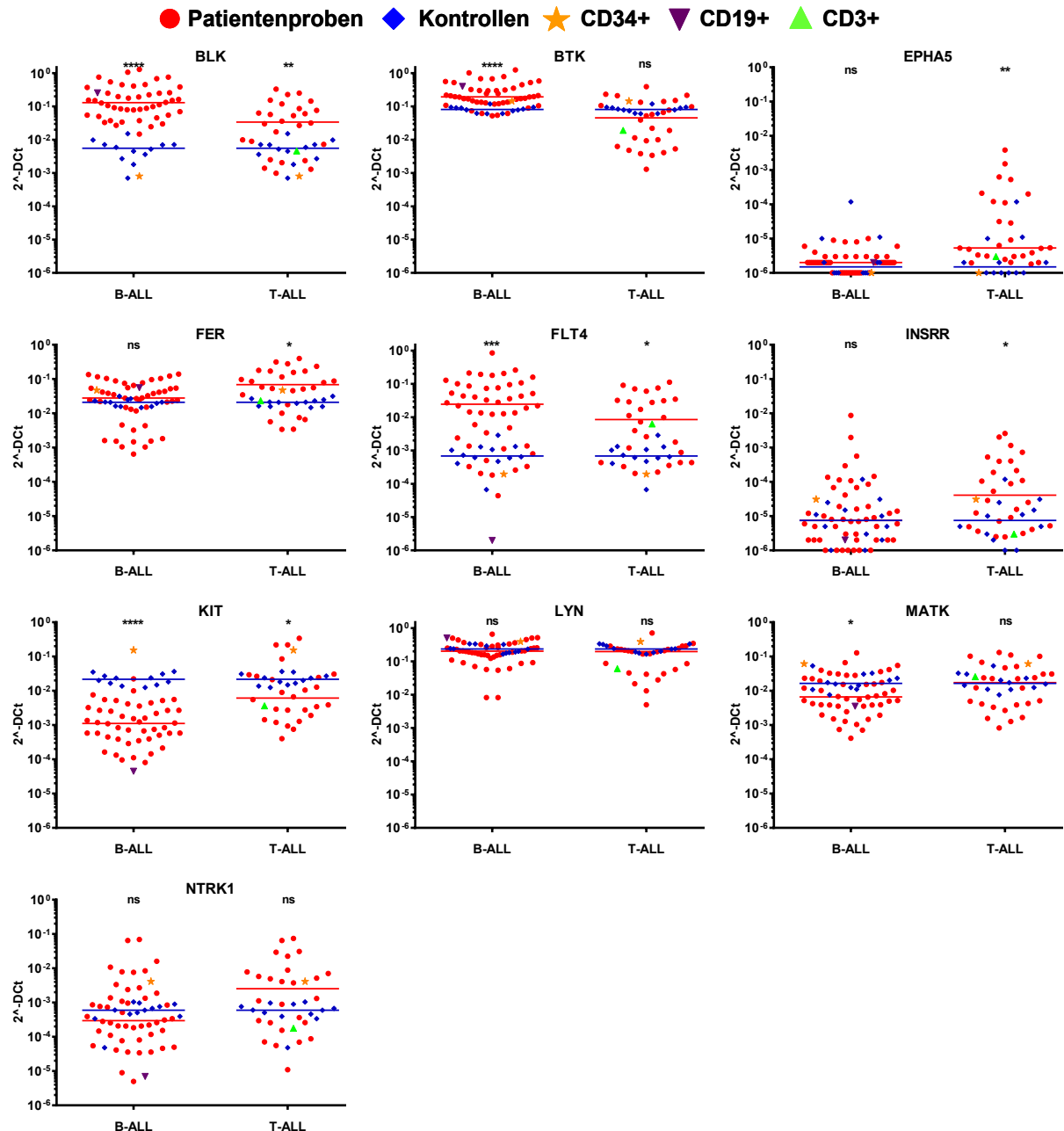


**Abbildung 3-9: Verringert exprimierte Tyrosinkinasen in akuter T-lymphatischer Leukämie (mittlere  $2^{-DDCt}$ -Wert  $\leq 0,2$ )**

Die Analyse der Expression erfolgte mittels der *TaqMan® Array Card* (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-DDCt}$ -Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind  $2^{-DDCt}$ -Werte von **CD19+**, **CD3+** und **CD34+** Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-DDCt} = 2^{-DDCt} \text{ ALL} / 2^{-DDCt} \text{ NP}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant  
\*  $p < 0,05$       \*\*  $p < 0,01$       \*\*\*  $p < 0,001$       \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### 3.1.8.1 Differierende Expressionsmuster der T-ALL

Bei variierender Expression zwischen verschiedenen T-ALL Proben wiesen oftmals die thymische T-ALL-Zellen eine geringere Kinase-Expression auf. Dies wurde für die Tyrosinkinasen *FLT4*, *INSRR*, *MATK*, *NTRK1*, *LYN* und *BTK* beobachtet. Die hier untersuchten Patienten mit thymischer T-ALL waren mit einem medianen Alter von 31 Jahren vergleichsweise jung und alle männlichen Geschlechts.



**Abbildung 3-10: Tyrosinkinasen mit variierender Expression in akuter T-lymphatischer Leukämie**

Die Analyse der Expression erfolgte mittels der *TaqMan® Array Card* (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-\Delta C_t}$  Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind  $2^{-\Delta C_t}$  Werte von CD19+, CD3+ und CD34+ Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-\Delta \Delta C_t} = 2^{-\Delta C_t \text{ ALL}} / 2^{-\Delta C_t \text{ NP}}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

\*\*\*  $p < 0,001$

\*\*\*\*  $p < 0,0001$

Die Gene **LYN** und **BTK** wurden in 75 % bzw. 100 % der thymischen T-ALL Proben verringert exprimiert. **MATK** wurde ebenfalls von sieben der acht Proben verringert exprimiert. Eine geringe **MATK**-Expression scheint zudem mit einer hohen Expression des CD10-Antigens assoziiert zu sein. Eine **CD10**-Expression konnte im Mittel bei 75 % der Zellen dieser Gruppe festgestellt werden, bei T-ALLs mit unveränderter **MATK**-Expression waren nur 4 % der Zellen CD10 positiv. **NTRK1** wurde von 80 % der Patienten mit reifer T-ALL und 75 % der prä T-ALLs verstärkt exprimiert, während die thymischen T-ALL Proben eine unveränderte oder verringerte Expression zeigten. **FLT4** wurde von 63 % der prä T-ALLs und 90 % der reifen T-ALLs verstärkt exprimiert, während 7/8 der thymische T-ALLs eine unveränderte Expression aufwiesen. Eine verstärkte **INSRR**-Expression war in 63 % der prä T- (5/8) und 70 % der reifen T-ALLs (7/10) vorzufinden, während in thymischen ALLs das Gen ausgeschaltet war. Insgesamt ist das **INSRR**-Expressionslevel mit Ct-Werten zwischen 31 - 36 aber auch in den überexprimierenden Proben niedrig. Die Kinasen FER und BLK zeigten in thymischen und reifen T-ALLs eine besonders starke Expression. **FER** wurde von 74 % der thymischen T-ALLs und 40 % der reifen T-ALLs, **BLK** von 70 % der reifen und 50 % der thymischen T-ALLs um mindestens das 4-fache verstärkt exprimiert.

Das **EPHA5**-Gen war in fast allen ALL-Patienten ausgeschaltet, nur eine kleine Gruppe meist junger Patienten (im Median 31 Jahre alt) mit einem hohen Anteil weiblicher Patienten (45 %) zeigte eine messbare Expression.

Mit Ausnahme von 3 prä T-ALLs und einer thymische T-ALL zeigten die meisten leukämischen Zellen eine verringerte Expression des Stammzellmarkers **KIT**. Die erhöhte **KIT**-Expression dieser vier Proben wurde auch über die Immunphänotypisierung mit dem cKIT-Antikörper bestätigt.

**Tabelle 3-6: Variierende TK-Expression in T-ALL Patienten**

ALL-Subtypen, Alter- und Geschlechtsverteilung (m/w = männlich/weiblich; [n] = Anzahl)

Gen	Expression	m/w [18/8]	Alter (Median)	prä T-ALL [8]	thymische ALL [8]	reife T-ALL [10]
BLK	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	15/4	38	4	5	7
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	2/1	39	2	2	2
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	2/3	31	3	1	1
BTK	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	1/3	52	1	0	3
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	5/4	40	5	0	4
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	12/1	24	2	8	3
EPHA5	erhöht ( $2^{-DDCt} > 80$ )	5/3	25	2	4	2
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	13/5	40	6	4	8
FER	erhöht ( $2^{-DDCt} > 4$ )	11/7	31,5	2	7	4
	unverändert ( $2^{-DDCt} 3 - 0,5$ )	3/4	31	5	1	1
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	5/1	44	1	0	5
FLT4	erhöht ( $2^{-DDCt} > 5$ )	9/8	38	5	1	9



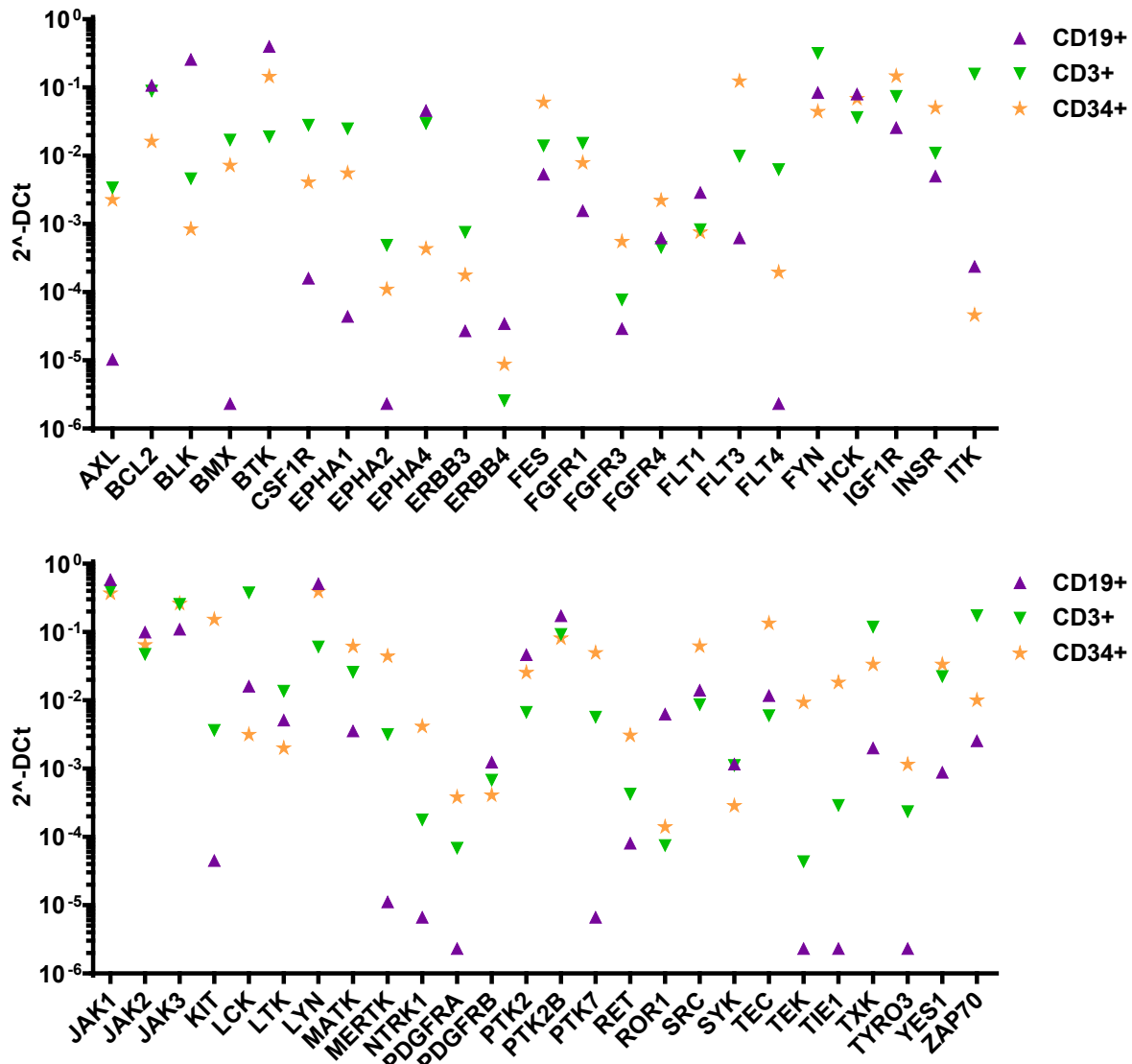
	unverändert ( $2^{-DDCt} 4 - 0,3$ )	10/1	27	3	7	1
INSRR	erhöht ( $2^{-DDCt} > 15$ )	7/4	38	5	0	6
	unverändert ( $2^{-DDCt} 15 - 0,5$ )	11/4	36	3	8	4
KIT	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	3/1	49	3	1	0
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	3/4	36	2	1	4
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	12/3	31	3	6	6
LYN	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	0/1	64	1	6	3
	unverändert ( $2^{-DDCt} 3 - 0,5$ )	10/6	42	7	2	7
MATK	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	2/5	31	4	0	3
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	6/2	45	3	1	4
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	10/1	23	1	7	3
NTRK1	erhöht ( $2^{-DDCt} > 2$ )	9/5	39	6	0	8
	unverändert ( $2^{-DDCt} 2 - 0,5$ )	2/2	40	1	2	1
	verringert ( $2^{-DDCt} < 0,5$ )	7/1	24	1	6	1

### 3.1.9 Tyrosinkinase-Expression gesunder Stamm-, T- und B-lymphatischer Zellen

Zur Bestimmung der Tyrosinkinase-Expression in nicht entarteten B- und T- lymphatischen Zellen sowie von Stammzellen erfolgte eine Isolierung von CD3+, CD19+ oder CD34+ Zellen aus dem Knochenmark gesunder Personen. Die Effektivität der Aufreinigung wurde über FACS-Analysen kontrolliert und ergab eine 97 %ige Konzentration von CD3+, eine 96 %ige Konzentration von CD19+ Zellen und eine Reinheit von 93,6 % der CD34+ Stammzellen. Die zelltypspezifischen TK-Expressionsmuster könnten Hinweise auf neue immunologische Marker liefern. Marker sind Proteine, welche typischerweise nur von bestimmten Zellarten exprimiert werden. Die Kombination verschiedener Marker ermöglicht eine Unterteilung sehr ähnlicher Zelltypen, wie beispielsweise die verschiedenen Reifegrade sich entwickelnder Blutzellen. Die Identifizierung neuer Marker könnte zu einer genaueren Einteilung verschiedener Zellentitäten beitragen.

Kenntnisse über die Tyrosinkinase-Expression in CD34+-Stammzellen lieferten Hinweise, welche Tyrosinkinasen für Erhaltung von Stammzell-Eigenschaften, wie unendliches Proliferationsvermögen, wichtig sein könnten.

In Abbildung 3-11 sind die  $2^{-DDCt}$ -Expressionswerte der Tyrosinkinasen dargestellt, welche unterschiedliche Expressionen zwischen B-, T- und Stammzellen aufwiesen.



**Abbildung 3-11: Unterschiedlich exprimierte Tyrosinkinasen in CD3+, CD19+ und CD34+ hämatopoetischen Zellen.**

In Abbildung 3-11 ist zu erkennen, dass sich die Expression der Tyrosinkinasen zwischen CD19+ B-Zellen, CD3+ T-Zellen und CD34+ Stammzellen oftmals stark unterscheidet. Beispielsweise konnte die B-zellspezifische Expression der *B-lymphoid Kinase* (*BLK*) nachgewiesen werden und eine stammzelltypische Expression von *KIT* und *FLT3*.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von CD34+ Zellen ergaben zudem eine vergleichsweise hohe Expression der Tyrosinkinasen *MERTK*, *PTK7*, *TEC*, *TEK* und *TIE1* in Stammzellen. CD3+ T-Zellen waren durch die hohe Expression von *CSF1R*, *FLT4*, *ITK*, *LCK* und *ZAP70* gekennzeichnet. B-Zellen hingegen zeigten eine Inaktivierung vieler Tyrosinkinasen wie *AXL*, *BMX*, *EPHA2*, *FLT4*, *MERTK*, *NTRK1*, *PDGFRA*, *PTK7*, *TEK*, *TIE1* und *TYRO3*.

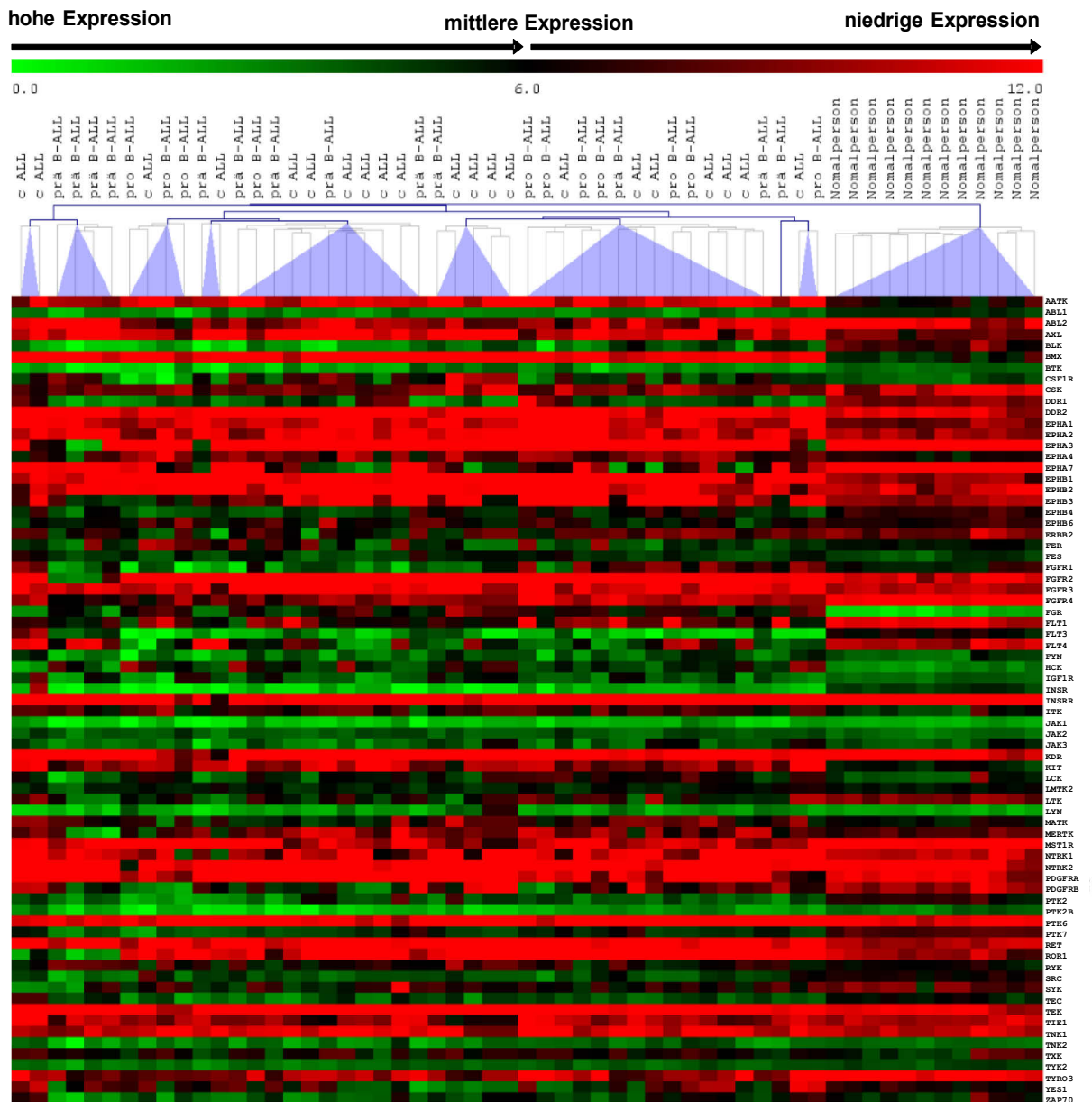
In den CD34+ Stammzellen war der größte Teil der TK-Gene ähnlich stark exprimiert wie in gesunden, ausgereiften Lymphozyten. Eine um das mindestens 4-fache höhere Expression der Stammzellen im Vergleich zu den ausgereiften Lymphozyten zeigten die Gene *DDR1*, *FGFR2*, *FGFR4*, *FLT3*, *JAK3*, *KIT*, *MERTK*, *MST1R*, *NTRK1*, *PTK7*, *RET*, *SRC*, *TEC*, *TEK*, *TIE1* und *TYRO3*. Von diesen waren die Gene *FGFR4*, *PTK7*, *SRC* und *TYRO3* in den leukämischen B- und T-Zellen ähnlich stark exprimiert. Die Expression von *FLT3* und *MST1R* zeigte eine ähnlich hohe Expression in B-ALL Zellen; die *JAK3*-, *NTRK1*- und *TEC*-Expression war vergleichbar mit der T-leukämischer Zellen.

Eine verringerte Expression in Stammzellen im Vergleich zu den reifen Zellen wiesen die Gene *BLK*, *CSF1R*, *EPHA4*, *FGR*, *ITK*, *LCK* und *NTRK2* auf. Von diesen Genen war in der T-ALL die Expression von *CSF1R* und *FGR* ähnlich niedrig.

### 3.1.10 Clusteranalyse

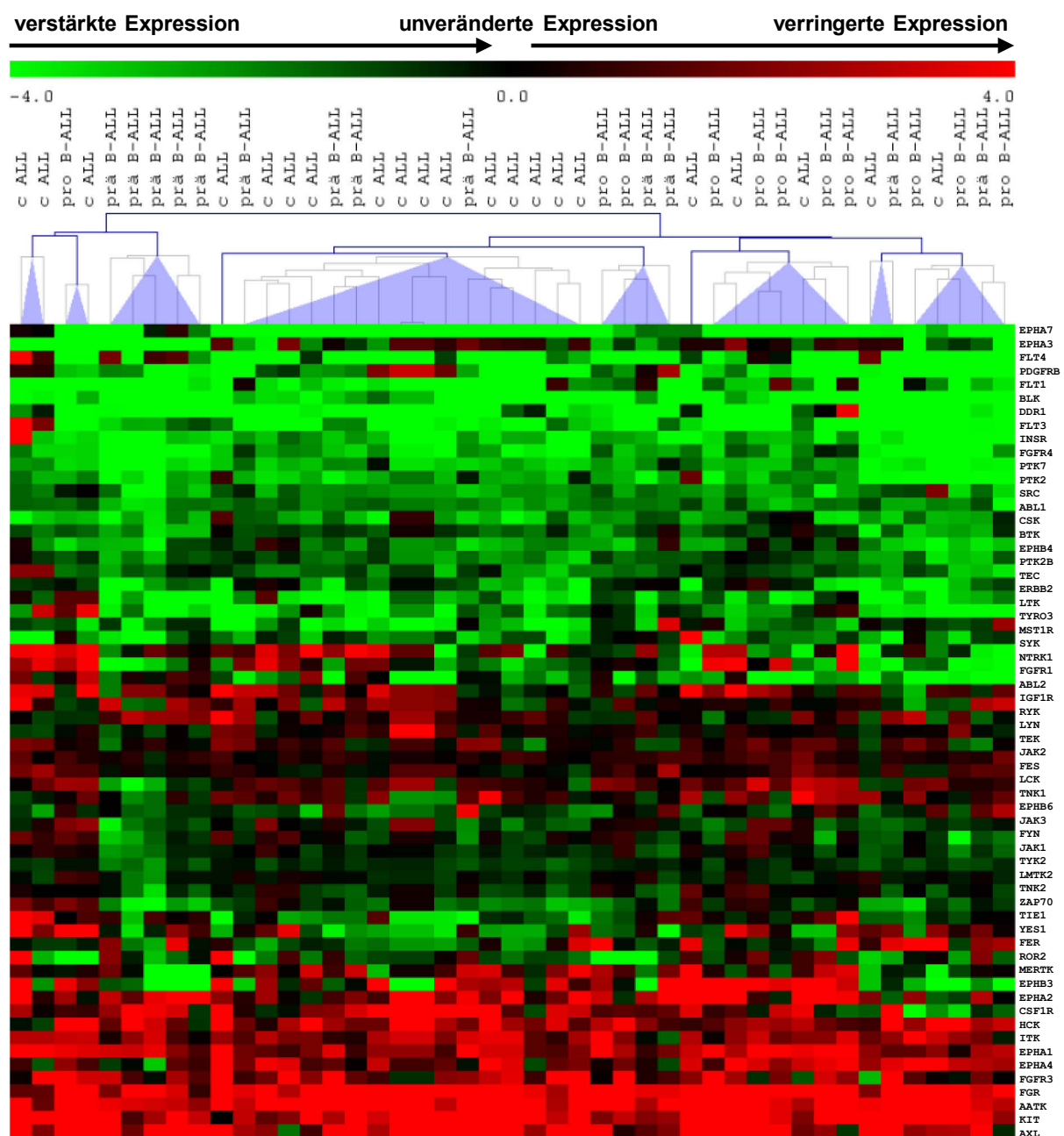
Mittels der Software *Multi experiment viewer V4.9* (MEV4.9) (Saeed et al., 2003) wurden sogenannte *Heatmaps* der DCt und DDcT-Werte erstellt. Dabei repräsentieren grüne Bereiche Gene, welche hoch bzw. verstärkt exprimiert wurden und rote Bereiche niedrig bzw. verringert exprimierte Gene. Eine dunkle Färbung entspricht einer mittleren bzw. unveränderten Expression. Von der Analyse wurden Gene, welche eine sehr niedrige Expression ( $Ct \geq 34,5$ ) in allen analysierten Proben aufwiesen, ausgeschlossen.

Die Programm-Funktionen HCL-tree (*hierarchical clustering tree*), SOM (*self organisation map*) und KMC (*K-means clustering*) der MEV-Software erlaubten eine Gruppierung der Expressionsergebnisse mit verschiedenen mathematischen Methoden, d.h. es wurden Cluster von Patienten mit ähnlichen Expressionsprofilen erstellt. Mittels der hierarchischen Clusteranalyse des HCL-trees werden verwandte Expressionsmuster so gruppiert, dass Patientendaten mit den größten Übereinstimmungen in räumlicher Nähe angeordnet und über Verzweigungen zusammengefasst werden. Die Höhe der Verzweigungen gibt dabei die Ähnlichkeit zwischen den Proben wieder: je niedriger diese liegen, desto ähnlicher sind die Expressionsprofile.



**Abbildung 3-12: Tyrosinkinasen-Expression in B-ALL: HCL-tree und Heatmap der DCT-Werte von B-Linien ALL Proben und Normalpersonen**

Die Distanzberechnung erfolgte mittels *Distance Metric Pearson* im MultiExperiment Viewer. Rot entspricht einem niedrigen und grün einem hohen DCT-Wert.



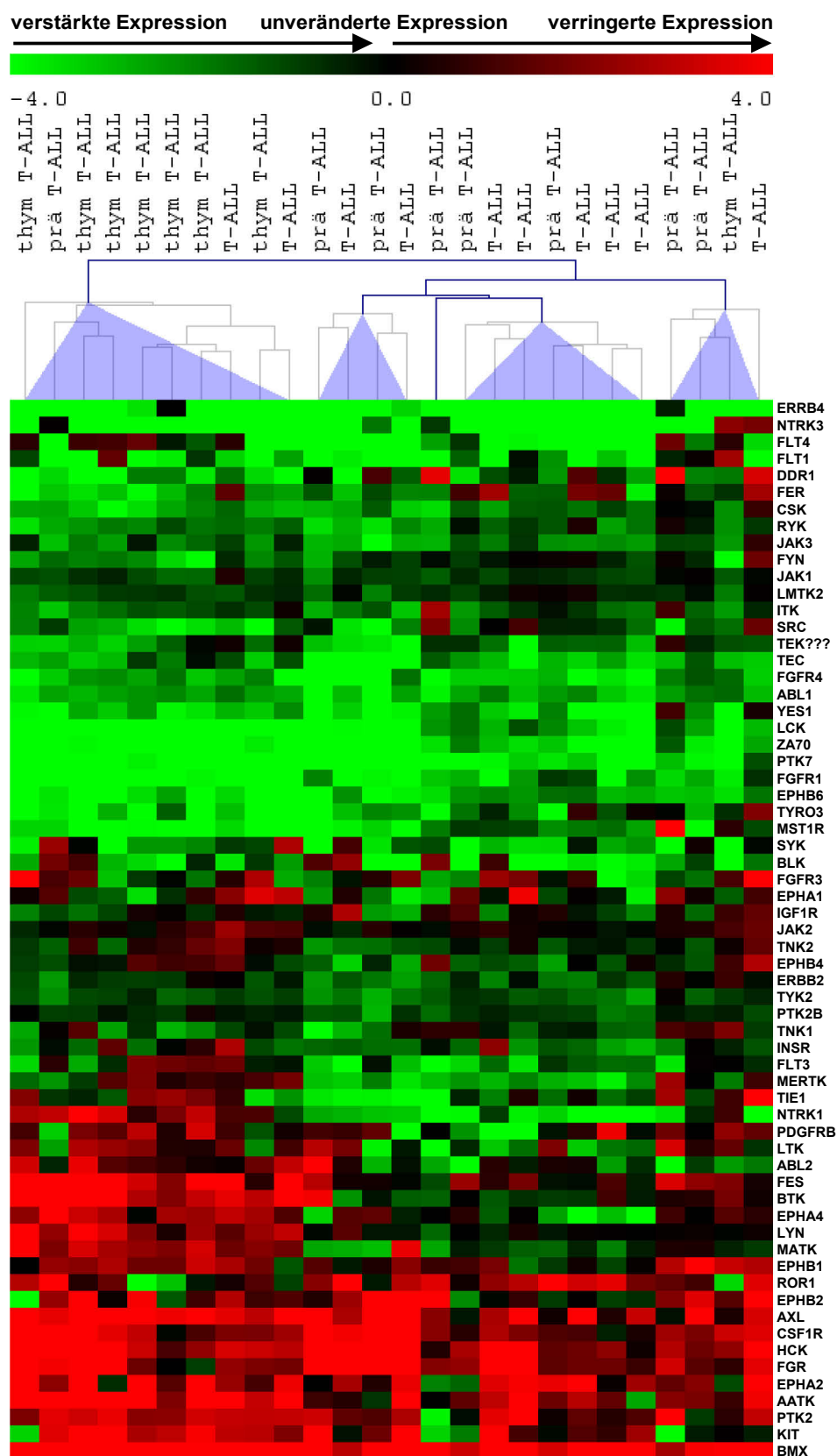
**Abbildung 3-13: Expressionsveränderungen in B-ALL: HCL-tree und Heatmap der DDCT-Werte der B-Linien ALL Proben**

Die Distanzberechnung erfolgte mittels *Distance Metric Euclidean* im MultiExperiment Viewer. Rot entspricht einem hohen, grün einem niedrigen DDCT-Wert. Dunkle Bereiche repräsentieren eine unveränderte Expression.



**Abbildung 3-14: Tyrosinkinasen-Expression in T-ALL: HCL-tree und Heatmap der DCt-Werte von T-Linien ALL Proben und Normalpersonen**

Die Distanzberechnung erfolgte mittels *Distance Metric Pearson* im MultiExperiment Viewer. Rot entspricht einem niedrigen und grün einem hohen DCt-Wert.



**Abbildung 3-15: Expressionsveränderungen in T-ALL: HCL-tree und Heatmap der DDCT-Werte der T-Linien ALL Proben**

Die Distanzberechnung erfolgte mittels *Distance Metric Euclidean* im MultiExperiment Viewer. Rot entspricht einem hohen, grün einem niedrigen DDCT-Wert. Dunkle Bereiche repräsentieren eine unveränderte Expression.

Anhand der Heatmap der **DCt-Werte** von Tyrosinkinasen lassen sich die Expressionsunterschiede übersichtlich veranschaulichen. Niedrige DCt-Werte (**grün**) entsprechen einer hohen Expression, hohe DCt-Werte (**rot**) einer niedrigen Expression der entsprechenden Tyrosinkinasen. Der deutliche Unterschied der TK-Expression von Patienten mit **B-Linien ALL** im Vergleich zu denen von Normalpersonen ist in Abbildung 3-12 zu erkennen. Dies spiegelt sich auch in dem hierarchischen Clustering wieder, welches in der ersten Gabelung alle Leukämieproben und alle Normalpersonen in je einer Gruppe zusammenfasst. Die verschiedenen Kontrollproben wiesen eine sehr einheitliche TK-Expression auf, das TK-Expressionsprofil der B-ALL Proben variierte etwas stärker.

In Abbildung 3-13 ist der *HCL-tree* der **DDCt-Werte** von **B-Linien ALLs** dargestellt. Dabei sind DDCt-Werte, welche eine mindestens 16-fache Überexpression aufweisen ( $DDCt \leq -4$ ) durch eine hellgrüne und alle DDCt-Werte mit einer um das mindestens 16-fache verringerten Expression ( $DDCt \geq 4$ ) durch eine hellrote Färbung repräsentiert. Im oberen Bereich der Graphik sind die Gene mit der stärksten Überexpression, wie *EPHA7*, *FLT1*, *FLT3*, *FLT4*, *DDR1*, *BLK*, *PTK7* und *PTK2* abgebildet. Im unteren Bereich befinden sich stark verringert exprimierte Tyrosinkinase-Gene, wie beispielsweise *AXL*, *FGR*, *KIT*, *AATK* und *FGFR3*.

Anhand des TK-Expressionsprofils lassen sich keine Patientengruppen voneinander unterscheiden und der immunologische Reifegrad der B-lymphatischen Leukämie hat keinen Einfluss auf das Expressionsprofil. Auch Alter, Geschlecht oder spezifische immunologische Marker zeigten keine Korrelationen mit dem Tyrosinkinase-Expressionsprofil. Die Clustermethoden KMC und SOM ergaben ein ähnliches Bild.

In Abbildung 3-14 ist der *HCL-tree* der **DCt-Werte** der Tyrosinkinase-Expression von **T-Linien ALLs** und Normalpersonen dargestellt. Auch hier zeigte das Tyrosinkinase-Expressionsprofil einen deutlichen Unterschied von T-ALL-Patienten zu Normalpersonen. Zudem wiesen die verschiedenen T-ALL-Subtypen zum Teil eine unterschiedliche TK-Expression auf, wobei die Clusterbildung aber nicht exakt an den Grenzen des immunologischen Reifegrads verlief. Sieben der acht thymischen T-ALLs wurden zusammen mit einer prä T-ALL und zwei reifen T-ALL-Proben in einem Cluster zusammengefasst. Diese prä T-ALL und reifen T-ALL-Proben zeigten also eine starke Ähnlichkeit zu dem Expressionsmuster thymischer T-ALLs. Die thymische T-ALL-Probe mit abweichendem Expressionsprofil hatte einen vergleichsweise niedrigen Blastenanteil, so dass das Ergebnis durch gesunde Zellen beeinflusst sein könnte. Auch eine Gruppe von sechs der zehn reifen T-ALLs zeigte ein übereinstimmendes Expressionsprofil, welches von den der übrigen T-ALL Proben abwich. Die Immunphänotypisierungen, der Altersdurchschnitt oder das Geschlecht dieser prä T-ALL- und reifen T-ALL-Proben zeigten jedoch keine Unterschiede zu den übrigen T-ALL-Proben.



Die Clusterbildung der **DDCt-Werte** von T-Linien ALLs mittels des HCL-trees (Abbildung 3-15) führte zu einem vergleichbaren Ergebnis. Besonders verstärkt exprimiert TK sind im oberen Teil der Abbildung dargestellt, wie beispielsweise die Gene *ERBB4*, *NTRK3*, *FLT4*, *FLT1*, *PTK7*, *LCK*, *YES1* und *ZAP70*. Stark verringert exprimierte Gene wie *BMX*, *KIT*, *PTK2*, *AATK*, *HCK*, *CSF1R* und *AXL* befinden sich im unteren Teil der Graphik.

Das Expressionsprofil der Tyrosinkinasen ließ eine eindeutige Unterscheidung zwischen T- und B-Linien ALL zu, welche verschiedene Subgruppen zugeordnet wurden (Ergebnisse nicht dargestellt). Das Expressionsmuster von Normalpersonen erlaubte eine eindeutige Abgrenzung zu dem der Leukämieproben, wobei T-ALLs eine tendenziell größere Ähnlichkeit zu diesen aufwiesen als B-ALL Proben.

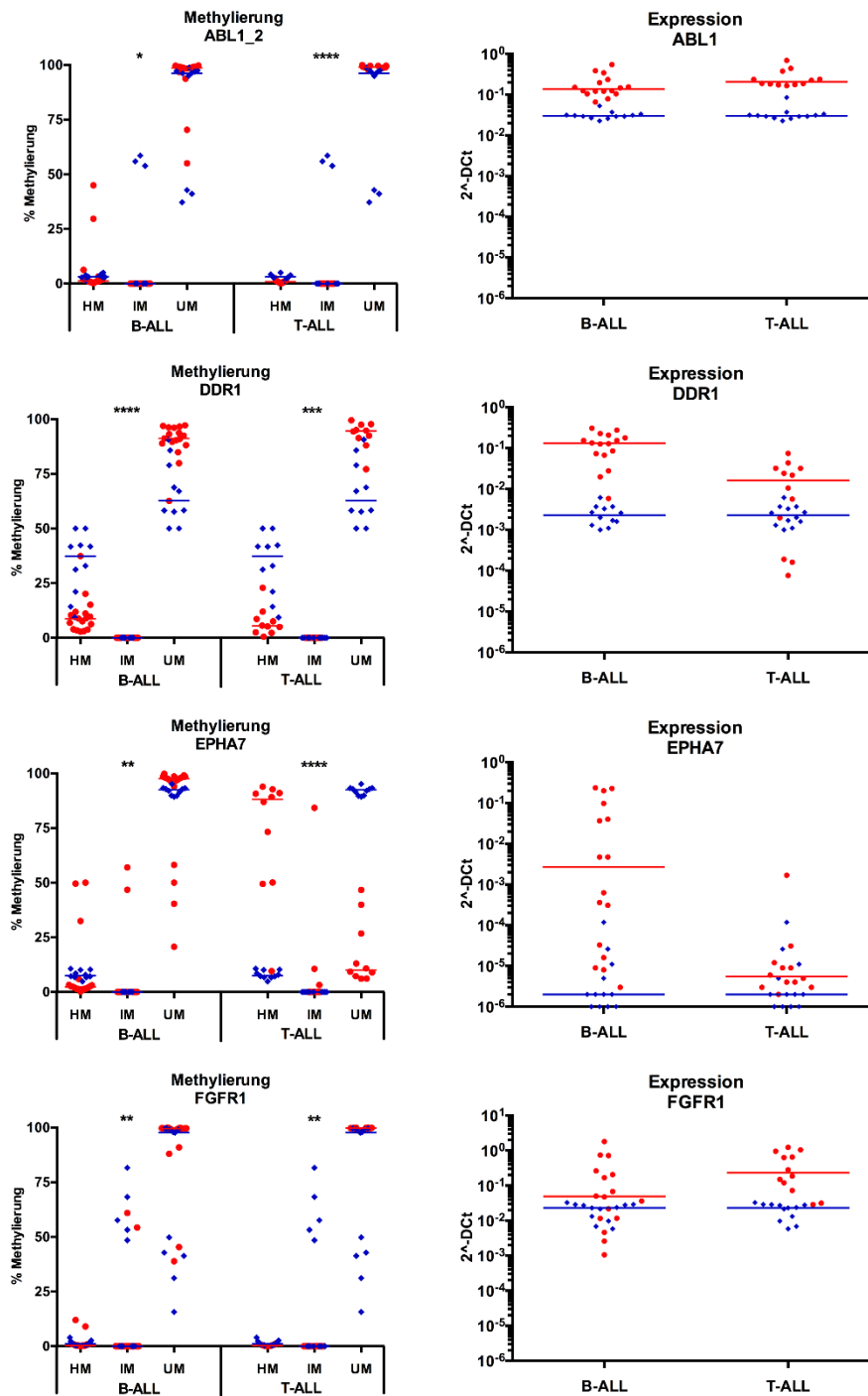
### 3.2 Methylierungsanalyse

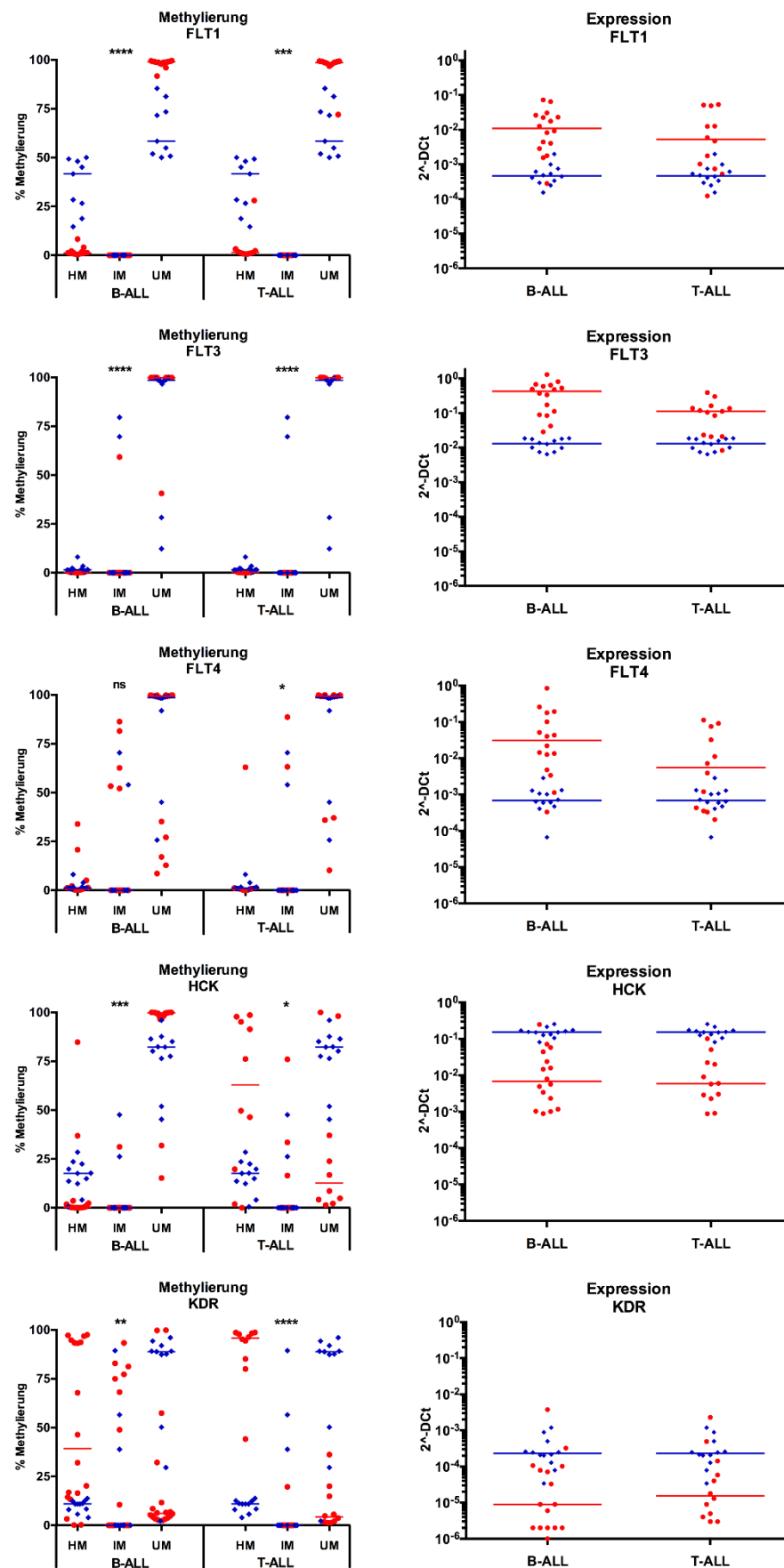
Neben Mutationen beeinflussen epigenetische Veränderungen die Leukämieentstehung. Ein weitverbreiteter epigenetischer Regulationsmechanismus besteht in der Hyper- und Hypomethylierung von DNA. Ein Gen mit unmethylierter Promotorregion ist für Transkriptionsfaktoren zugänglich und kann exprimiert werden, eine Hypermethylierung hingegen führt zur Ausschaltung des Gens.

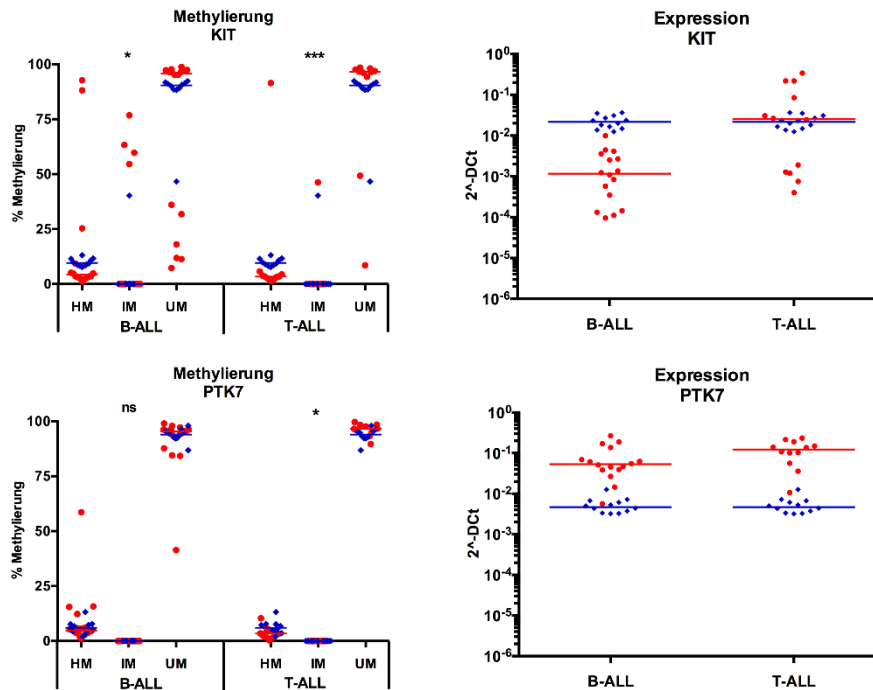
In dieser Arbeit wurde der Methylierungszustand von CpG-Inseln der Promotorregionen elf exemplarisch ausgewählter Tyrosinkinasen analysiert. Dies gibt Einblick inwiefern epigenetische Veränderungen in Form von DNA-Methylierungen an den veränderten Expressionsprofilen beteiligt waren. Mittels des *EpiTect Methylation Arrays* (SABBioScience, Hilden) wurde die Methylierung von zwölf Genabschnitten untersucht. Dazu wurde die genomische DNA von zehn T-ALL Patienten, 14 B-ALL Patienten und neun Normalpersonen mit methylierungssensitiven und methylierungsunsensitiven Restriktionsenzymen geschnitten und die dadurch entstanden DNA-Fragmente über quantitative PCR bestimmt. Mit den Ergebnissen der qPCR wurde für jede Probe der prozentuale Anteil an unmethylierter DNA (UM), hypermethylierter DNA (HM), d.h. dem Anteil vollständig methylierter DNA-Fragmente, und partiell (intermediär-) methylierter (IM) DNA berechnet. In Abbildung 3-16 sind die Ergebnisse für ALL-Proben (rot) und Normalpersonen (blau) dargestellt. Die entsprechende Expression der auf Methylierung untersuchten Proben ist ebenfalls abgebildet. Die statistische Signifikanz des Methylierungsunterschieds zwischen Normalpersonen und Leukämiepatienten wurde mittels eines zweiseitigen Mann-Whitney Tests berechnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  und ns = nicht signifikant), die Graphiken mit der *GraphPad Prism 6* Software erstellt.

● Patientenproben ◆ Kontrollen

HM: hypermethyliert IM: intermediär methyliert UM: unmethyliert







**Abbildung 3-16: Methylierungsanalyse der Promotorregionen von *ABL1*, *DDR1*, *EPHA7*, *FGFR1*, *FLT1*, *FLT3*, *FLT4*, *HCK*, *KDR*, *KIT* und *PTK7*.**

Die prozentuale Methylierung (Hypermethylierung (HM), intermediäre Methylierung (IM) und unmethylierte DNA (UM)) der Patientenproben ist in **rot**, die der Normalpersonen in **blau** dargestellt. Der Methylierungszustand der Promotor-DNA jeder Probe ist in Form der drei Datenpunkten HM, IM und UM wiedergegeben. Die Signifikanz ist folgendermaßen gekennzeichnet: ns: nicht signifikant

\*\* p < 0,01

\*\*\* p < 0,001

\* p < 0,05

\*\*\*\* p < 0,0001

Eine Zusammenfassung der Methylierungsanalyse (Median der prozentualen Hypermethylierung, Differenz  $\Delta M$  der Hypermethylierung zwischen ALL-Proben und Kontrolle, p-Werte) ist Tabelle 3-7 zu entnehmen.

Das ***ABL1***-Gen besitzt zwei verschiedene Promotoren, deren Methylierung hier analysiert wurde. *ABL1\_1* stellt den Promotor der Transkriptvariante b, *ABL1\_2* den Promotor der Transkriptvariante a dar. Der Promotor des *ABL1\_2* Promotors lag in ALL-Patienten und Normalpersonen meist vollständig unmethyliert vor. Die Analyse des *ABL1\_1* Promotors ergab bei nur zwei Kontrollproben ein verwertbares Messergebnis und erlaubte somit keine weitere Analyse.

Der Promotor des ***DDR1***-Gens, welches in B- und T-ALL häufig überexprimiert wurde, zeigte eine deutliche Abnahme der prozentualen Methylierung in Patientenproben im Vergleich zu den Normalpersonen. In den ALL-Proben war die DNA nahezu vollständig unmethyliert, in den Kontrollen lag die Methylierung bei durchschnittlich 37 %.

***EPHA7***, in B-ALL verstärkt exprimiert, zeigte in den B-Linien ALLs keine Methylierung, in Normalpersonen eine 5 %ige Methylierung. In den T-ALL Proben, welche nur eine geringe *EPHA7*-Expression aufwiesen, wurde eine um 80 % verstärkte Methylierung festgestellt.

**FLT1**, sowohl in B- als auch in T-ALL erhöht exprimiert, lag in allen Leukämieproben unmethyliert vor und wies somit eine durchschnittlich 40 % reduzierte Methylierung im Vergleich zu den Kontrollen auf.

Das **HCK**-Gen, welches sowohl in B- als auch T-Linien ALL verringert exprimiert wurde, zeigte in der B-ALL keine Methylierung, in Normalpersonen hingegen eine 17 %ige Hypermethylierung. In den T-ALL-Proben wurde eine deutlich verstärkte Methylierung der Promotor-DNA um 45 % festgestellt.

Das ebenfalls verringert exprimierte **KDR**-Gen war sowohl in einem Teil der B-ALL- und noch deutlicher in T-ALL-Proben verstärkt methyliert und lag dort nahezu vollständig hypermethyliert vor.

**Tabelle 3-7: Ergebnisse der Methylierungsanalyse**

Mediane  $\bar{x}$  der prozentualen Hypermethylierung, Differenz  $\Delta M$  zwischen der Methylierung von ALL-Proben und Kontrollen, Signifikanz p.

Gen	$\bar{x}$ HM B-ALL	$\bar{x}$ HM T-ALL	$\bar{x}$ HM Kontrolle	$\Delta M$ B-ALL	$\Delta M$ T-ALL	p-Wert B-ALL vs. NP	p-Wert T-ALL vs. NP
ABL1_1	1.745	1.315	22.73	- 21 %	- 21,4 %	0,0131	0,0303
ABL1_2	1.275	0.895	3.24	- 2 %	- 2,4 %	0,0135	< 0,0001
DDR1	8.8	5.42	37.3	- 28,5 %	- 31,9 %	< 0,0001	0,0001
EPHA7	2.44	88.07	7.575	- 5,1 %	+ 80,5 %	0,0056	< 0,0001
FGFR1	0.35	0.215	1.07	- 0,7 %	- 0,86 %	0,0097	0,0021
FLT1	1.19	1.385	41.64	- 40,5 %	- 40,1 %	< 0,0001	0,0002
FLT3	0.185	0.13	1.6	- 1,42 %	- 1,47 %	< 0,0001	< 0,0001
FLT4	0.65	0.665	1.085	- 0,4 %	- 0,4 %	0,1615	0,0232
HCK	0.33	62.91	17.66	- 17,3 %	+ 45,3 %	0,0006	0,0356
KDR	39.22	95.76	10.93	+ 28,3 %	+ 84,8 %	0,0026	< 0,0001
KIT	4.215	3.39	9.615	- 5,4 %	- 6,2 %	0,0198	0,0015
PTK7	4.63	3.415	6,065	- 1,4 %	- 2,6 %	0,5669	0,0431

Einen nur sehr geringen Unterschied in der Methylierung wiesen die Gene für **FGFR1**, **FLT3**, **FLT4**, **KIT** und **PTK7** auf. Diese waren sowohl in Normalpersonen als auch in ALL-Patienten nahezu vollständig unmethyliert. Die acht stark exprimierten Gene **ABL1**, **DDR1**, **FGFR1**, **FLT1**, **FLT3**, **FLT4**, **KIT** und **PTK7** waren in allen Leukämieproben unmethyliert und somit zugänglich für Transkriptionsfaktoren. In der T-ALL war eine Hypermethylierung in den drei Genen **EPHA7**, **HCK** und **KDR** feststellbar, in der B-ALL wies ausschließlich das **KDR**-Gen eine Hypermethylierung auf.

### 3.3 Wachstumsanalysen

In weiteren Untersuchungen wurde die Wirkung einer Überexpression der Tyrosinkinasen *FLT4*, *EPHA7* und *ERBB4* auf verschiedenen Leukämiezelllinien untersucht. Dazu wurden die Zelllinien zunächst auf Expression dieser Tyrosinkinasen überprüft und die Zelllinien mit der geringsten Expression für die Transfektions-Experimente ausgewählt. In diesen Zellen wurde somit erst über die Aufnahme der Vektoren eine starke Überexpression erreicht. Neben den humanen B- und T-lymphatischen ALL-Zelllinien wurde zudem die murine pro B-Zelllinie BaF3 mit den verschiedenen Expressionskonstrukten transfiziert. Diese ist in ihrem Wachstum Interleukin-2 (IL2) abhängig. Eine Überwindung der Wachstumsinhibition in IL2-freiem Medium und das Erreichen eines IL2-unabhängigen Wachstums ist ein Hinweis auf wachstumsstimulierende Eigenschaften des transfizierten Gens. Mittels Tyrosinkinase-Inhibitoren wurde untersucht, ob eine Hemmung dieser Rezeptor-Tyrosinkinasen zu einer verringerten Proliferation beitragen kann und dies somit eine mögliche Therapieoption in der Behandlung von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie darstellen könnte.

Die Transfektion erfolgte mittels Amaxa, die Zellproliferation wurde über die colometrische Analyse der Zellviabilität basierend auf dem Schneiden des Tetrazoliumsalzes WST-1 bestimmt. Dabei ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Die relative Wachstumsrate wurde aus diesen Daten im Verhältnis zur Kontrolle, d.h. den mit dem Kontrollvektor *pcDNA3.1-empty* (kurz: pc3) transfizierten, unbehandelten Zellen, bestimmt. Die Transfektionseffizienzen wurden über FACS-Analysen GFP-transfizierter Zellen kontrolliert.

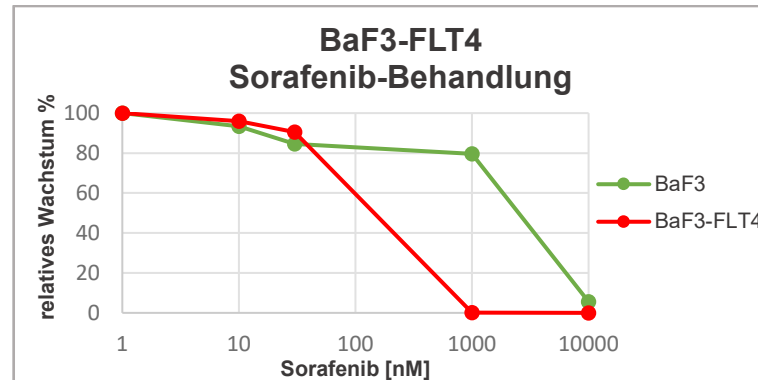
#### 3.3.1 FLT4 Wachstumsanalyse

Die Rezeptor-Tyrosinkinase *FLT4* lag in nahezu allen ALL-Proben überexprimiert vor. Da zudem bekannt ist, dass *FLT4* an der Entwicklung des Lymphsystems beteiligt ist (Kaipainen et al., 1995) und eine Aktivierung zur leukämische Zellproliferation, dem Überleben und der Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika beitragen kann (Dias et al., 2002), könnte der VEGFC-*FLT4* Signalweg ein potientes Ziel in der Behandlung akuter Leukämien darstellen. Eine spezifische Inhibition von *FLT4* wurde bisher nicht weiter untersucht.

Neben der B-lymphatischen ALL-Zelllinie Nalm 6 und der T-lymphatischen ALL-Zelllinie Molt 4, welche nur eine geringe *FLT4*-Expression aufwiesen, wurde die murine pro B-Zelllinie BaF3 transfiziert. Der *pcDNA3.1*-Vektor mit integriertem *FLT4*-Gen wurde freundlicherweise von Kari Alitalo (University of Helsinki) zur Verfügung gestellt. Als spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden Sorafenib und Sunitinib eingesetzt. Sorafenib, welches unter dem Handelsnamen Nexavar® vertrieben wird, ist ein Multikinase-Inhibitor, welcher u.a. *KDR*, *FLT3*, *PDGFR* und *KIT* beeinflusst. Sunitinib (Sutent®) ist ebenfalls ein Multikinase-Inhibitor mit inhibitorischer Wirkung gegenüber *KDR*, *FLT1*, *FLT3*, *FLT4*, *KIT*, *PDGFR*, *RET* und *CSF1R*.

Beide Tyrosinkinase-Inhibitoren sind für die Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren und Nierenzellkarzinomen zugelassen.

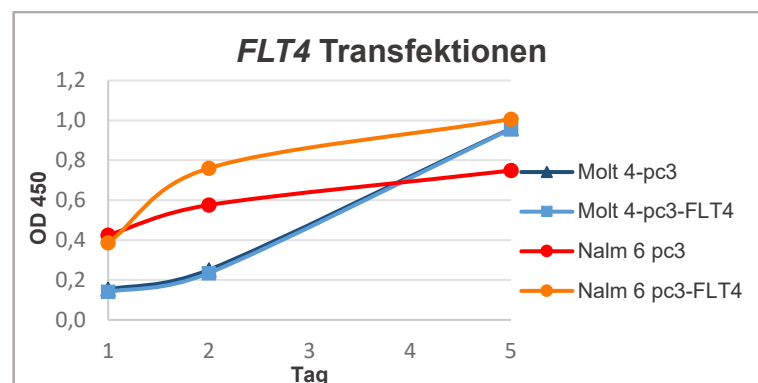
### 3.3.1.1 Sorafenib-Behandlung FLT4-transfizierter BaF3-, Molt4- und Nalm6-Zellen



**Abbildung 3-17: Sorafenibbehandlung IL2-unabhängiger, *FLT4*-überexprimierender BaF3-Zellen und IL2-abhängiger BaF3-Zellen**

Die Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von sechs Tagen.

Die *FLT4*-Überexpression ermöglichte der murinen B-Zelllinie BaF3 ein von IL2-unabhängiges Wachstum. Das Wachstum der pc3-*FLT4* exprimierenden BaF3-Zellen war in IL2-freiem Medium von der Aktivität der Tyrosinkinase FLT4 abhängig. Die spezifische Inhibition von FLT4 mittels Sorafenib führte bei BaF3-FLT4 Zellen bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M zum Zelltod. Die FLT4-unabhängigen BaF3-Zellen in IL2-haltigen Medium wurden bei dieser Konzentration kaum in ihrem Wachstum beeinträchtigt und zeigten bei einer Sorafenib-Konzentration von 1  $\mu$ M weiterhin ein relatives Wachstum von 80 %.

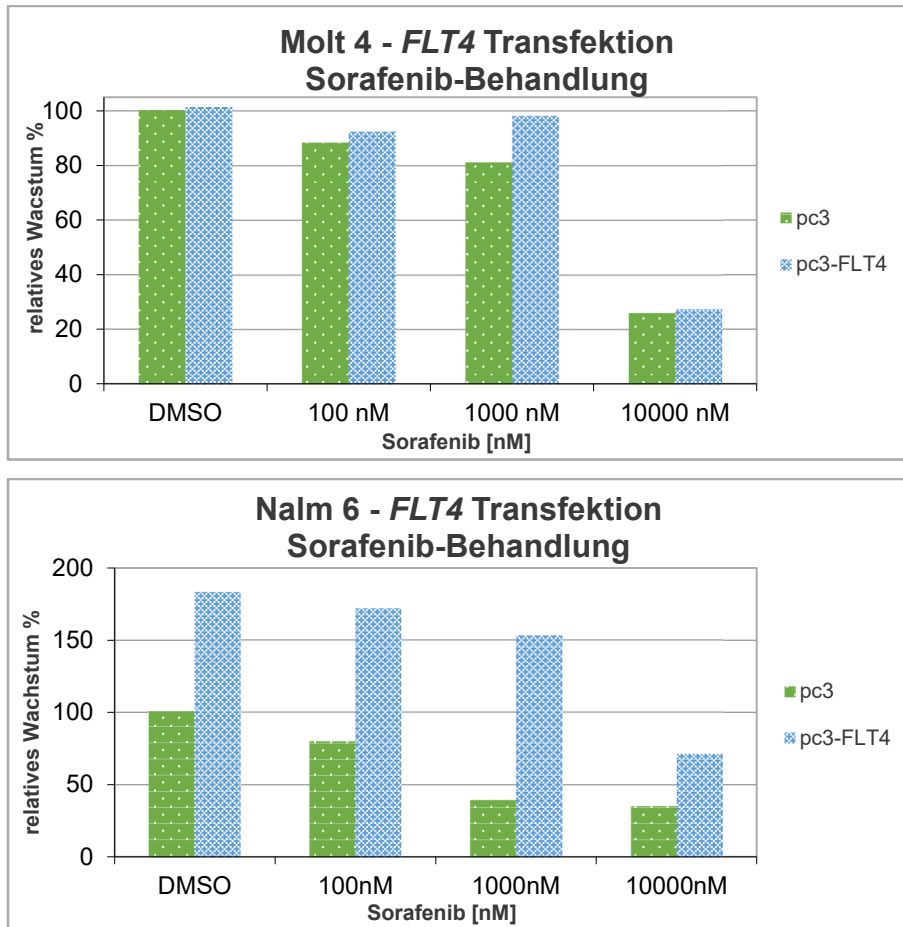


**Abbildung 3-18: Transiente *FLT4*-Transfektion von Molt 4- und Nalm 6-Zellen**

Die Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von fünf Tagen.

Die Effizienz der FLT4-Transfektion der T-ALL Zelllinie Molt 4 lag bei 43 %. Die unbehandelten *FLT4* transfizierten T-ALL Zellen zeigten über einen Zeitraum von fünf Tagen dasselbe Wachstum wie die Kontrollzellen.

Die Transfektionseffizienz der B-ALL-Zelllinie Nalm 6 betrug 24 %. Trotz dieser relativ niedrigen Effizienz wurde ein deutlich stärkeres Wachstum der FLT4-transfizierten Nalm 6-Zellen als die der pc3-transfizierten Zellen beobachtet.



**Abbildung 3-19: Wachstum von *FLT4* oder *pcDNA3.1empty* transient überexprimierenden Nalm 6- und Molt 4-Zellen ohne/mit Sorafenib-Behandlung**  
Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von fünf Tagen.

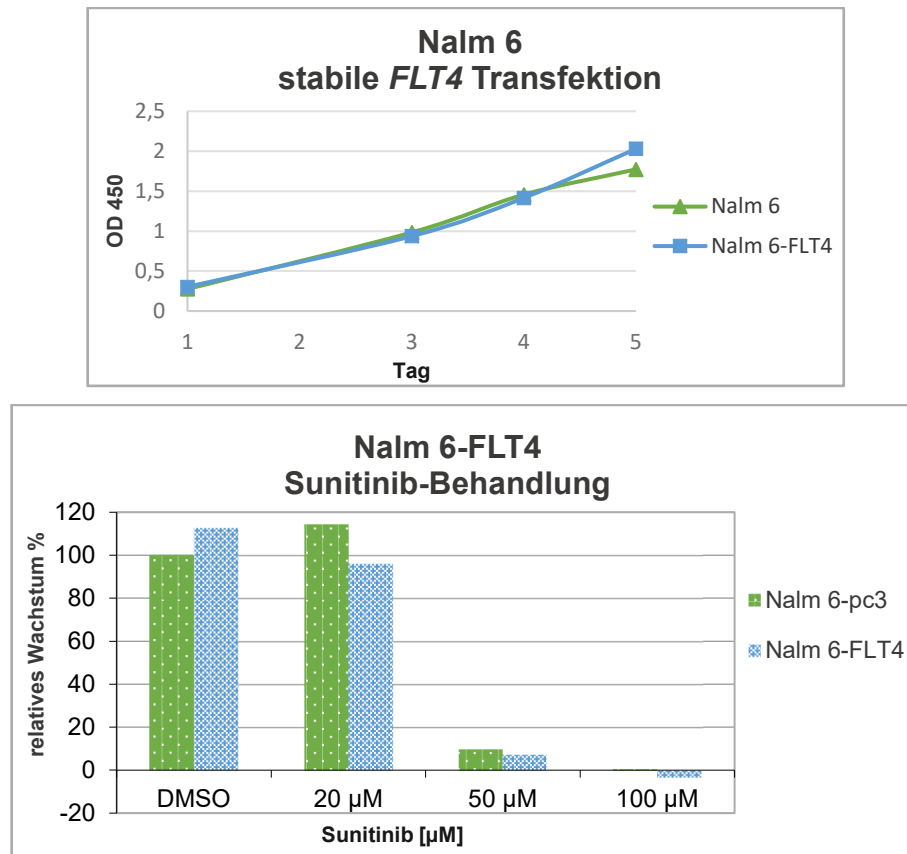
Der Einsatz von Sorafenib beeinflusste das Wachstum der transfizierten Molt 4-pc3 und Molt 4-FLT4 Zellen ähnlich stark. Eine Sorafenib-Konzentration von 1  $\mu$ M bewirkte eine geringe Reduktion der Proliferation, der Einsatz von 10  $\mu$ M führte zu einem Absterben von etwa 70 % der Zellen.

Die Nalm 6-FLT4-Zellen zeigten unbehandelt ein um etwa 80 % höheres Wachstum. Auch bei Sorafenib-Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M zeigten diese ein stärkere Proliferation. Eine 10  $\mu$ M Sorafenib-Konzentration bewirkte in pc3-*FLT4* überexprimierenden Nalm 6-Zellen eine Wachstumsinhibition von ca. 60 %. Das Wachstum der Kontrollzellen wurden bereits bei einer 1  $\mu$ M Sorafenib-Konzentration stark inhibiert

### 3.3.1.2 Sunitinib-Behandlung von Nalm 6-Zellen mit stabiler *FLT4*-Überexpression

Für das folgende Experiment wurde ein Nalm 6-Zellklon verwendet, welcher eine stabile Überexpression von *FLT4* um über das 100-fache aufwies. Dazu wurden die pc3-FLT4 transfizierten Nalm 6-Zellen selektioniert, vereinzelt und die stabile *FLT4*-Expression der hochgewachsenen Zellklone über quantitative PCR nachgewiesen.





**Abbildung 3-20: Wachstum von *FLT4* oder *pcDNA3.1empty* stabil überexprimierenden Nalm 6-Zellen ohne/mit Sunitinib-Behandlung**

Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von fünf Tagen.

Die um über das 100-fache stabile Überexpression von *FLT4* in der B-ALL Zelllinie Nalm 6 zeigte einen geringen Einfluss auf die Proliferation. Eine 20 µM Sunitinib-Konzentration führte in den Nalm 6-FLT4-Zellen zu einer leicht stärkeren Wachstumsreduktion im Vergleich zu den Nalm 6-Zellen ohne Überexpression von *FLT4*. Eine Sunitinib-Konzentration von 50 µM führte zum Absterben fast aller Zellen.

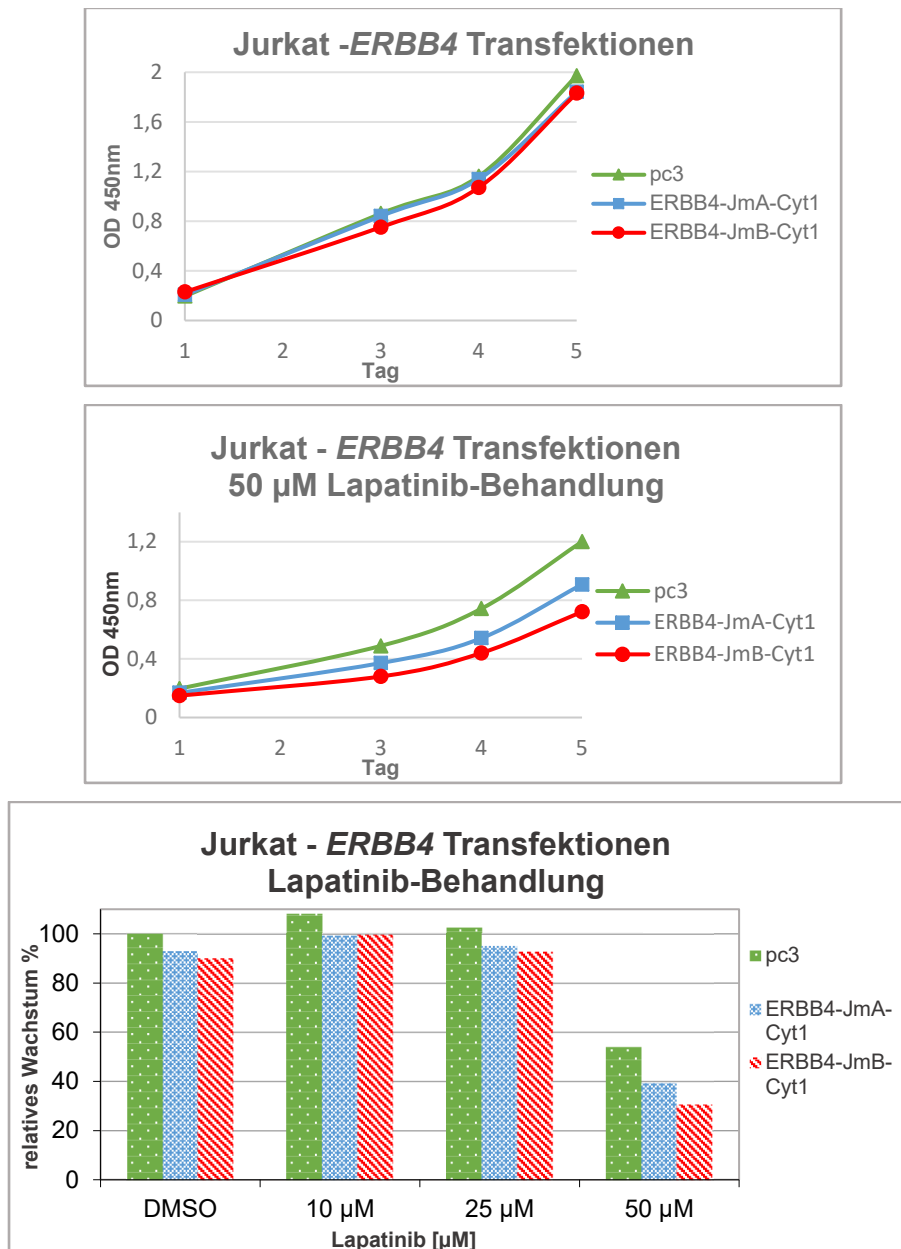
### 3.3.2 ERBB4 Wachstumsanalyse

Die Rezeptor-Tyrosinkinase *ERBB4* zeigte eine stark erhöhte Expression in Patienten mit T-ALL. *ERBB4*, welches genau wie das Proto-Onkogen *ERBB2* durch den Liganden Heregulin aktiviert wird, wurde bereits in Mammakarzinomen untersucht (Sundvall et al., 2008a). Ein Zusammenhang von *ERBB4* und Leukämieentstehung ist bisher nicht bekannt. Es wurden die beiden Isoformen *ERBB4 JmA-CYT1* und *ERBB4 JmB-CYT1* für die Transfektionen und Wachstumsanalysen eingesetzt. Diese beiden Genvarianten wurden im *pcDNA3.1*-Vektor von Klaus Elenius (University of Turku, Finnland) zur Verfügung gestellt.

Zur Inhibition von ERBB4 wurde der Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib (Handelsname Tykerb®) verwendet. Dieser wird zur Inhibition von ERBB1 und ERBB2 eingesetzt und ist u.a. für die Behandlung von ERBB2-positiven Mammakarzinomen zugelassen.

### 3.3.2.1 Lapatinib-Behandlung von *ERBB4* transfizierten Jurkat- und Molt4-Zellen

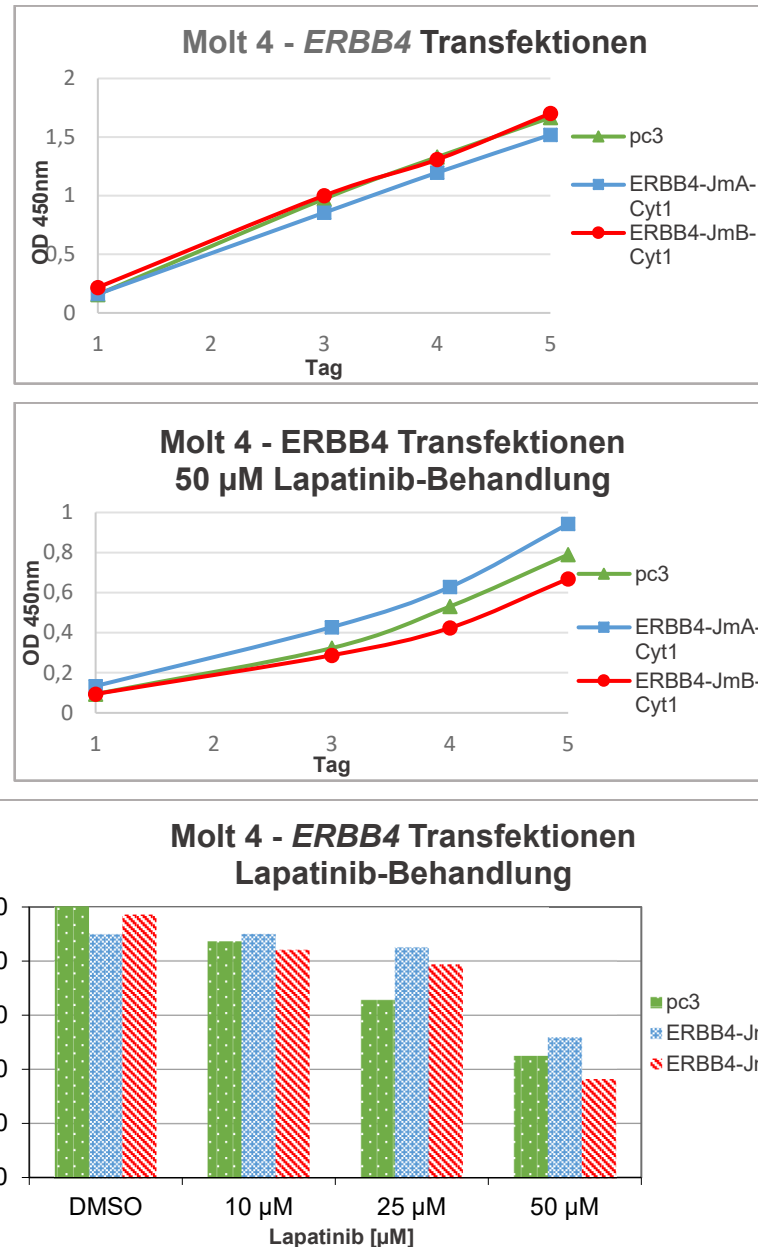
Durch die Transfektion von BaF3-Zellen mit den Vektoren pc3-ERBB4-JmA-CYT1 oder pc3-ERBB4-JmB-CYT1 wurde kein IL2-unabhängiges Wachstum erreicht.



**Abbildung 3-21: Wachstum von *ERBB4* JmA-CYT1, *ERBB4* JmB-CYT1 oder *pcDNA3.1empty* transfizierten Jurkat-Zellen ohne/mit Lapatinib-Behandlung**  
Die Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von fünf Tagen.

Die Transfektion der T-ALL Zelllinie Jurkat erreichte eine Effizienz von 72 %. Das Wachstum der unbehandelten, ERBB4-transfizierten Zellen unterschied sich nicht von dem der mit leerem Vektor transfizierten Zellen. Der Einsatz von 10 µM Lapatinib führte zu einer leicht erhöhten

Zellproliferation. Erst eine 50  $\mu\text{M}$  Konzentration inhibierte die Proliferation der Kontrolltransfektion um 46 %, die der Jurkat-ERBB4-JmA-Cyt1 Zellen um 58 % und die der Jurkat-ERBB4-JmB-Cyt1 Zellen um 66 %.



**Abbildung 3-22: Wachstum von *ERBB4 JmA-CYT1*, *ERBB4 JmB-CYT1* oder *pcDNA3.1empty* transfizierten Molt 4-Zellen ohne/mit Lapatinib-Behandlung**  
Die Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von fünf Tagen.

Die Transfektionseffizienz der T-ALL Zelllinie Molt 4 betrug 40 %. Die Transfektion mit den verschiedenen *ERBB4*-Isoformen bewirkte in unbehandelten Molt 4-Zellen keine Proliferationsveränderung. Eine 10  $\mu\text{M}$  Lapatinib-Konzentration hatte eine sehr geringe inhibitorische Wirkung, eine 25  $\mu\text{M}$  Konzentration reduzierte das Wachstum der Kontrollzellen um 35 %, die *ERBB4*-transfizierten Zellen wurden kaum inhibiert. Eine 50  $\mu\text{M}$  Lapatinib-Konzentration bewirkte eine Inhibition des Wachstums um ca. 40-60 %.

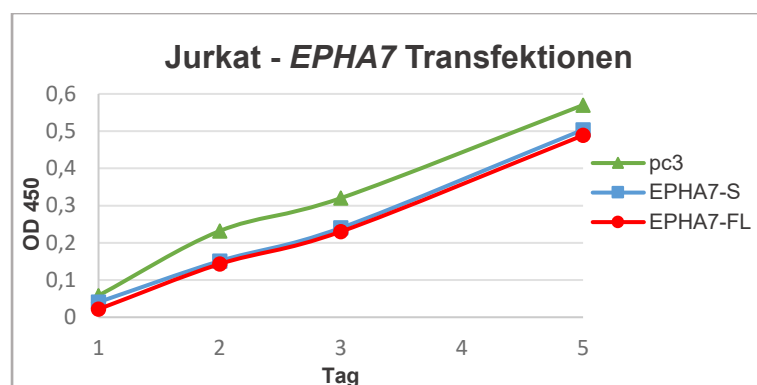
### 3.3.3 EPHA7 Wachstumsanalyse

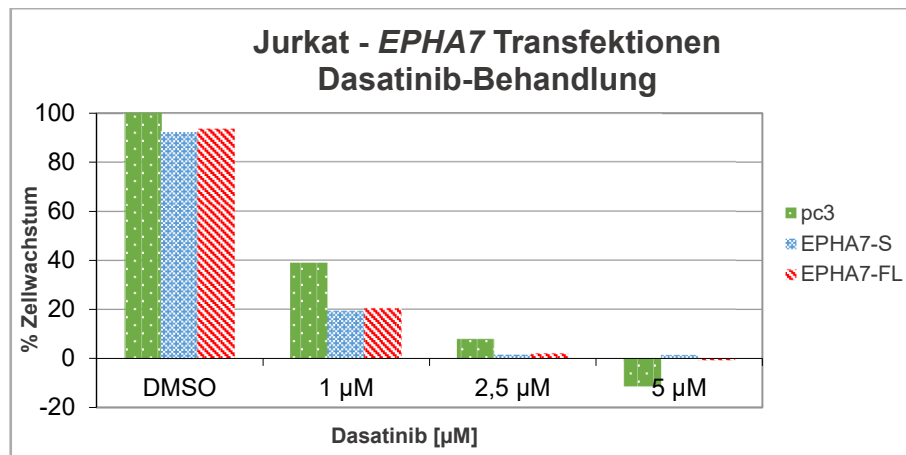
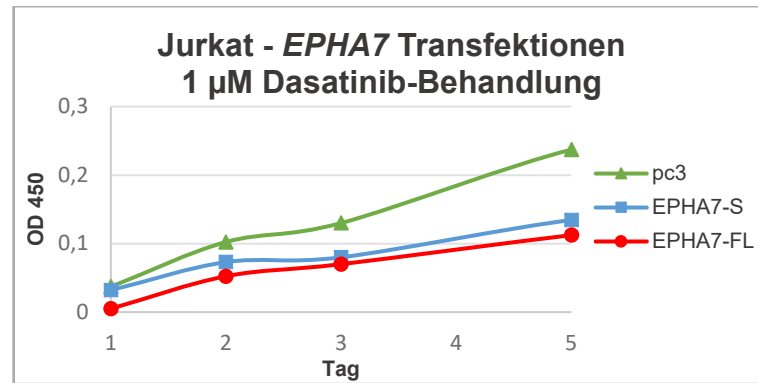
*EPHA7* wurde in den B-ALL-Proben meist sehr stark exprimiert, in Normalpersonen und T-ALL war es hingegen ausgeschaltet. *EPHA7* wird in zwei Spleißvarianten exprimiert, wovon die verkürzte, lösliche (*soluble*) Variante *EPHA7-S* für ein 451 AS großes Protein kodiert, welches nur aus dem extrazellulären Anteil besteht und als dominant negativer Inhibitor des Volllängezeptors *EPHA7-FL* (*full length*) agieren soll (Dawson et al., 2007; Sawamiphak et al., 2010).

Die beiden Isoformen *EPHA7-FL* und *EPHA7-S* wurden über die Amplifikation der cDNA einer Normalperson mittels *EPHA7-FL* oder *EPHA7-S* spezifischen Primern mit integrierten Restriktionsschnittstellen und einer gerichteten Klonierung in den *pcDNA3.1*-Vektor generiert. Für *EPHA7* sind keine spezifischen Inhibitoren bekannt und keiner der bekannten Inhibitoren wurden auf eine Wirkung gegenüber *EPHA7* getestet. Hier wurden als mögliche *EPHA7*-Inhibitoren Linifanib und Dasatinib eingesetzt. Linifanib ist ein noch nicht zugelassener Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher sich in der Phase III klinischer Studien befindet und bei *EPHA7*-Bindungsanalysen den geringsten K<sub>d</sub>-Wert der von *Karaman et al.* untersuchten Inhibitoren aufwies (Karaman et al., 2008). Dasatinib (Sprycel®) ist ein Multikinase-Inhibitor, welcher für die Behandlung von CML und BCR-ABL-positiver B-ALL zugelassen ist. Neben Inhibition der Tyrosinkinasen ABL1, ABL2, PDGFR, KIT und SRC wurde auch eine Wirksamkeit gegenüber *EPHA2* beobachtet (Chang et al., 2008).

#### 3.3.3.1 Dasatinib-Behandlung von *EPHA7* transfizierten Jurkat- und Nalm 6-Zellen

Durch die Überexpression von *EPHA7-FL* oder *EPHA7-S* in BaF3-Zellen konnte das IL2-abhängiges Wachstum nicht überwunden werden.

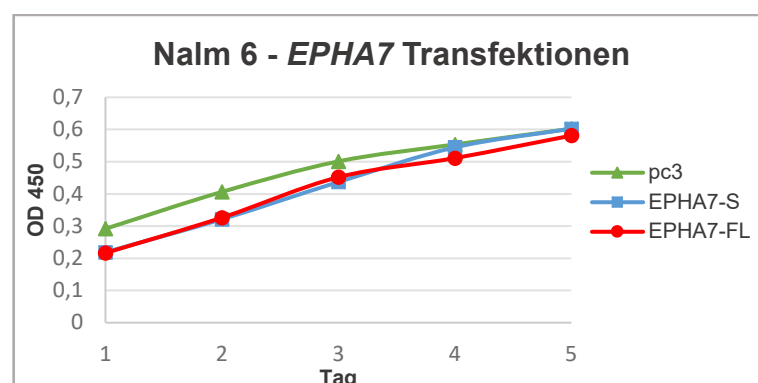


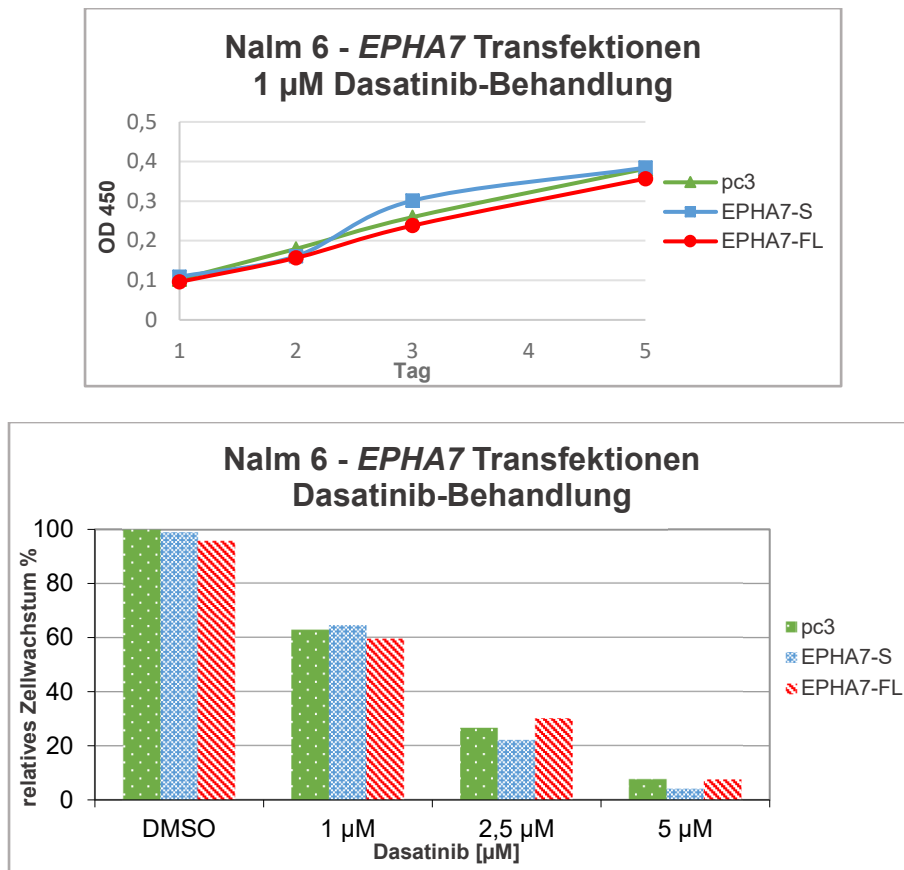


**Abbildung 3-23: Wachstum von *EPHA7-FL*, *EPHA7-S* oder *pcDNA3.1empty* transfizierten Jurkat-Zellen ohne/mit Dasatinib-Behandlung**  
Die Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von fünf Tagen.

Die Transfektionseffizienz der GFP-Kontrolle lag in den T-ALL Zelllinie Jurkat bei 70 % und mittels quantitativer PCR wurde eine um das 100-fache erhöhte Expression von *EPHA7-S* und eine 22-fach erhöhte Expression von *EPHA7-FL* ermittelt.

Unbehandelt zeigten die *EPHA7-FL* und *EPHA7-S* überexprimierenden Jurkat-Zellen eine unveränderte Proliferation. Eine 1  $\mu$ M Dasatinibkonzentration bewirkte eine Wachstumsreduktion der Kontrolltransfektion um ca. 60 % und um etwa 80 % der *EPHA7* überexprimierenden Zellen. Bei einer Konzentration von 2,5  $\mu$ M Dasatinib wurden nahezu alle Jurkat-Zellen abgetötet.





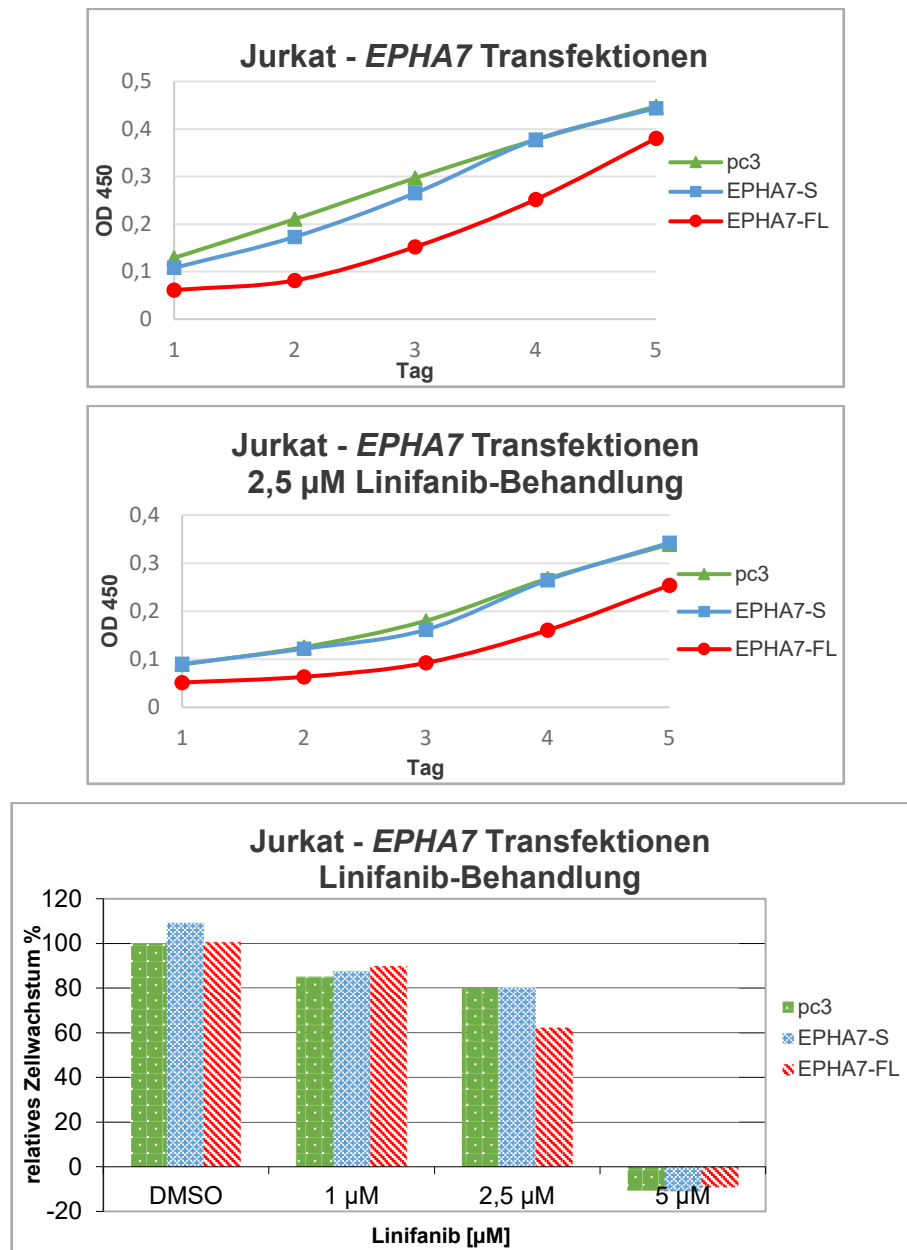
**Abbildung 3-24: Wachstum von *EPHA7-FL*, *EPHA7-S* oder *pcDNA3.1empty* transfizierten Nalm 6-Zellen ohne/mit Dasatinib-Behandlung**

Die Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von fünf Tagen.

Die Transfektionseffizienz der B-ALL Zelllinie Nalm 6 betrug zwischen 40 – 50 %. Die *EPHA7*-Expression wurde durch Transfektion mit dem pc3-*EPHA7-S* Vektor um das 900-fache erhöht, die pc3-*EPHA7-FL* Transfektion bewirkte eine mindestens 53-fache Überexpression.

Das Wachstum der unbehandelten Zellen wurde durch die Überexpression von *EPHA7-FL* oder *EPHA7-S* nicht beeinflusst. Die Dasatinib-Behandlung zeigte in allen Zelltypen eine vergleichbare Reduktion des Wachstums. Eine 1 µM Dasatinib-Konzentration führte zu einer Verringerung der Zellproliferation um ca. 40 %, 2,5 µM um ca. 70 % und 5 µM um ca. 90 %. Eine 10 µM Dasatinib-Konzentration bewirkte das Absterben aller Nalm 6-Zellen.

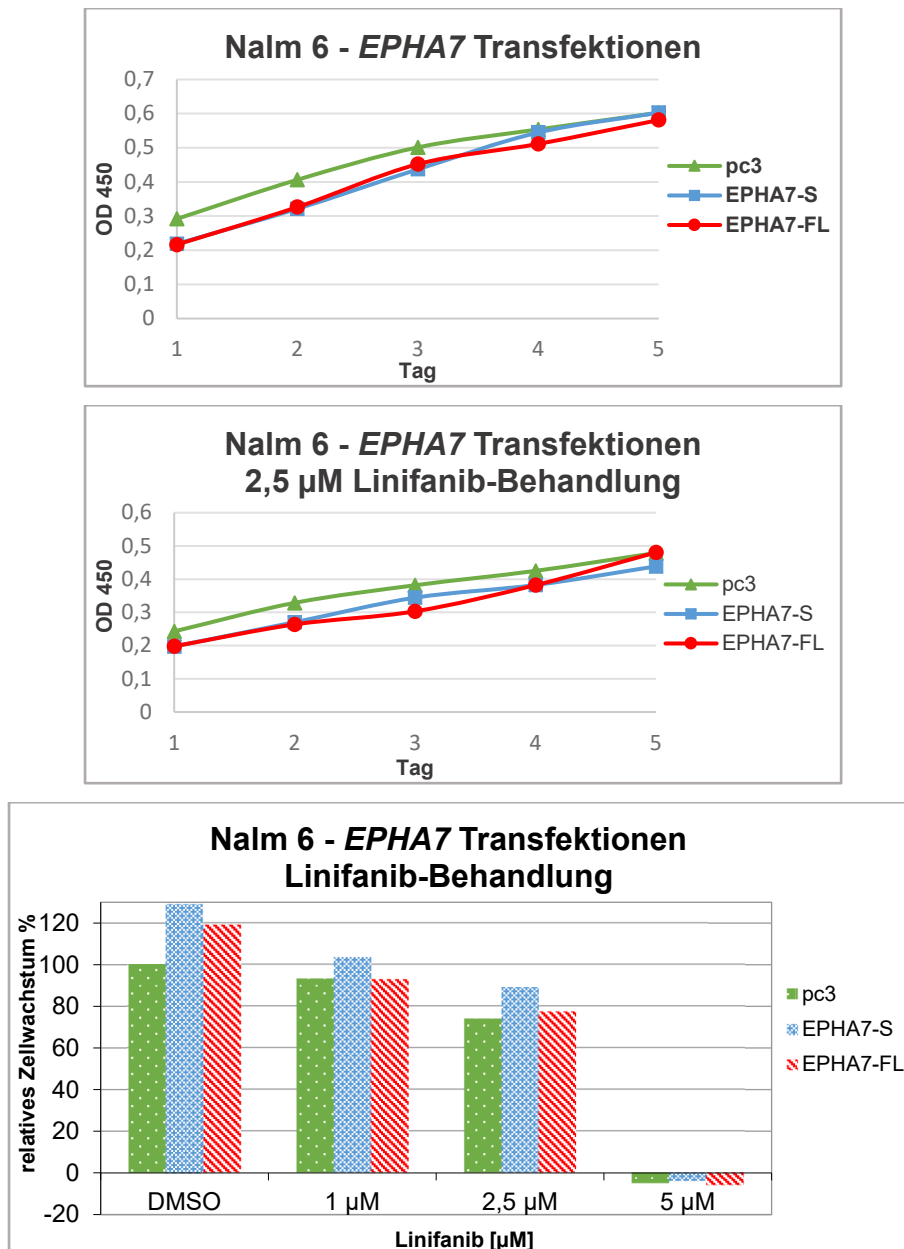
### 3.3.3.2 Linifanib-Behandlung von *EPHA7* transfizierten Jurkat- und Nalm 6-Zellen



**Abbildung 3-25: Wachstum von *EPHA7*-FL, *EPHA7*-S oder *pcDNA3.1empty* transfizierten Jurkat-Zellen ohne/mit Linifanib-Behandlung**

Die Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von fünf Tagen.

Die *EPHA7*-Überexpression beeinflusste das Wachstum der unbehandelten Jurkat-Zellen kaum. Eine 1 µM Linifanib-Konzentration bewirkte eine nur geringe Wachstumsreduktion. Eine 2,5 µM Konzentration reduzierte das Wachstum der *EPHA7*-FL überexprimierenden Zellen um 40 %, das der *EPHA7*-S exprimierenden Zellen und der Kontrolle um etwa 20 %. Eine 5 µM Linifanib-Konzentration bewirkte das Absterben aller Zellen.



**Abbildung 3-26: Wachstum von EPHA7-FL, EPHA7-S oder pcDNA3.1empty transfizierten Nalm 6-Zellen ohne/mit Linifanib-Behandlung**

Die Messung des Wachstums erfolgte mittels WST-1 über einen Zeitraum von fünf Tagen.

Die Transfektion von Nalm 6-Zellen mit den beiden *EPHA7*-Isoformen bewirkte eine leichte Steigerung der Proliferation. Eine 1 µM Linifanib-Konzentration inhibierte diese um ca. 15 %, der Einsatz von 2,5 µM Linifanib um ca. 20 %, eine 5 µM Konzentration führte zum Absterben aller Zellen.



## 3.4 Sequenzanalyse

### 3.4.1 Sequenzpolymorphismen der Tyrosinkinasen

Veränderungen in den kodierenden Sequenzabschnitten von Tyrosinkinase-Genen können deren Aktivitätszustand beeinflussen, z.B. über aufgehobene Autoinhibition, Liganden-unabhängige Dimerisierung oder veränderte Bindungsaffinitäten.

Die Sequenzierungen erfolgten durch das *Max Planck-Genomzentrum* Köln. Sequenziert wurden PCR-Produkte, welche aus cDNA oder genomischer DNA der ALL-Proben und Kontrollproben generiert wurden. Die sequenzierten Proben wurden anhand der Expressionsdaten ausgewählt.

#### Tabelle 3-8 Tyrosinkinase Sequenzierungen

Stille Mutationen sind nicht aufgeführt. TK: Tyrosinkinase; CTD: C-terminale Domäne; CRD: *Cysteine Rich Domain*; rs: *reference SNP cluster ID*

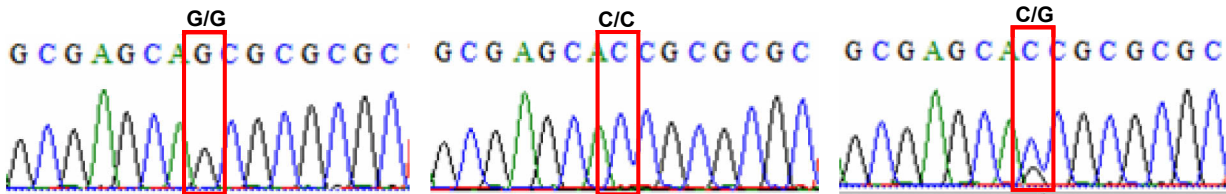
Gen	sequenzierte Domäne	sequenzierte Probenanzahl	Mutationen
BLK	TK-Domäne	8 Proben	keine
EPHA7	TK-Domäne	6 Proben	keine
ERBB4	TK-Domäne	7 Proben	keine
ERBB4	CRD-Domäne	7 Proben	keine
FGFR1	TK-Domäne	6 Proben	keine
FLT3	TK-Domäne	9 Proben	keine
FLT4	TK-Domäne	7 Proben	3 Proben: heterozygoter Polymorphismus Nt 2670 CAC→CAG H890Q rs448012
FLT4	CTD-Domäne	9 Proben	3 Proben: heterozygoter Polymorphismus Nt 3971 CGG→CTG R1324L rs307821 1 Probe mit kryptischen Exon
PTK7	TK-Domäne	5 Proben	keine
NTRK3	TK-Domäne	10 Proben	keine
ROR1	TK-Domäne	7 Proben	4 Proben: heterozygoter Polymorphismus Nt 1553 ACG → ATG T518M rs7527017
LCK	TK-Domäne	6 Proben	keine
TEC	TK-Domäne	6 Proben	keine

Die cDNA-Sequenzanalyse der ALL-Proben ergab neben stillen Mutationen Sequenzvariationen in den Genen von *FLT4* und *ROR1*. In der *FLT4* RTK wurden Sequenzpolymorphismen innerhalb der katalytisch aktiven Tyrosinkinase-Domäne und der substratbindenden C-terminalen Domäne detektiert. Eine Probe enthielt ein unbekanntes kryptisches Exon. Die Sequenzanalyse der Tyrosinkinase *ROR1* ergab einen Polymorphismus innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne.

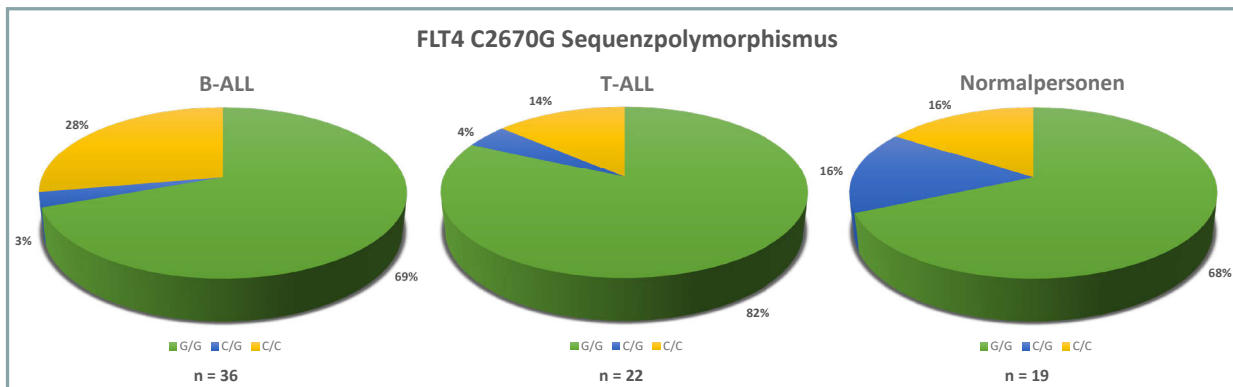
### 3.4.1.1 *FLT4* Sequenzanalyse

#### 3.4.1.1.1 Sequenzanalyse der *FLT4* Tyrosinkinase-Domäne

Die Punktmutation C2670G in der Tyrosinkinase-Domäne von *FLT4* führt zu einem Austausch der Aminosäure 890 von Histidin zu Glutamin und wurde heterozygot in drei der sieben sequenzierten Stichproben nachgewiesen. Über weitere Sequenzierungen genomischer DNA wurde die Frequenz dieses Polymorphismus in ALL- und Kontrollproben ermittelt.



**Abbildung 3-27: *FLT4* C2670G Sequenzpolymorphismus (rs448012): Sequenzierungsergebnisse der genomischen DNA**

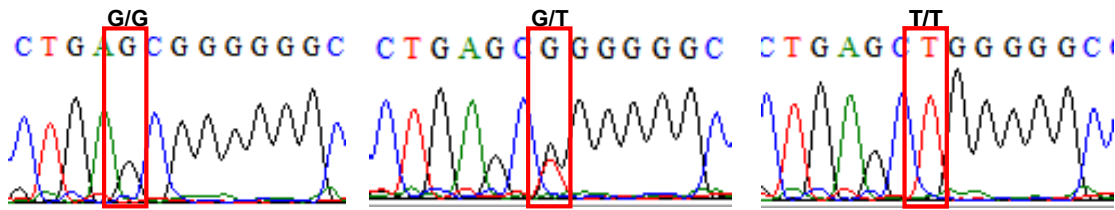


**Abbildung 3-28: *FLT4* C2670G Sequenzpolymorphismus (rs448012): Verteilung in B-ALL, T-ALL und Kontrollen**

Der größte Teil der Leukämie- und Kontrollproben war homozygot für die Sequenzvariante G/G. In der B-Linien ALL lag der Sequenzpolymorphismus G/G homozygot in 69 %, in der T-Linien ALL in 81 % und bei Normalpersonen in 68 % der untersuchten Proben vor. Es war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der C/G-Verteilung zwischen Leukämiepatienten und Normalpersonen feststellbar.

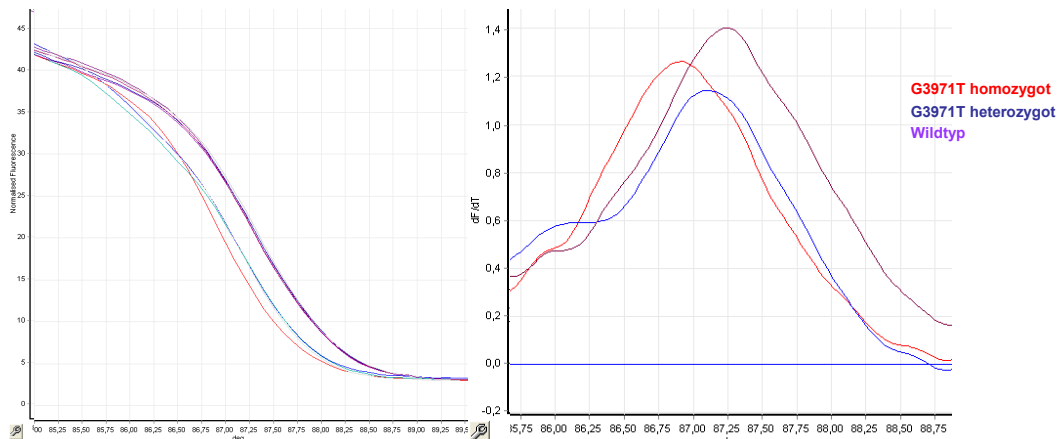
#### 3.4.1.1.2 Sequenzanalyse der *FLT4* C-terminalen Domäne

Die C-terminale Domäne von *FLT4* dient in phosphorylierter Form als Bindestelle für nachfolgende Signalproteine mit PTB- oder SH-Domänen. Drei der neun sequenzierten cDNA-Proben enthielten den Polymorphismus G3971T. Diese führt zu einem Austausch der positiv geladenen Aminosäure 1324 Arginin gegen die neutrale Aminosäure Leucin.

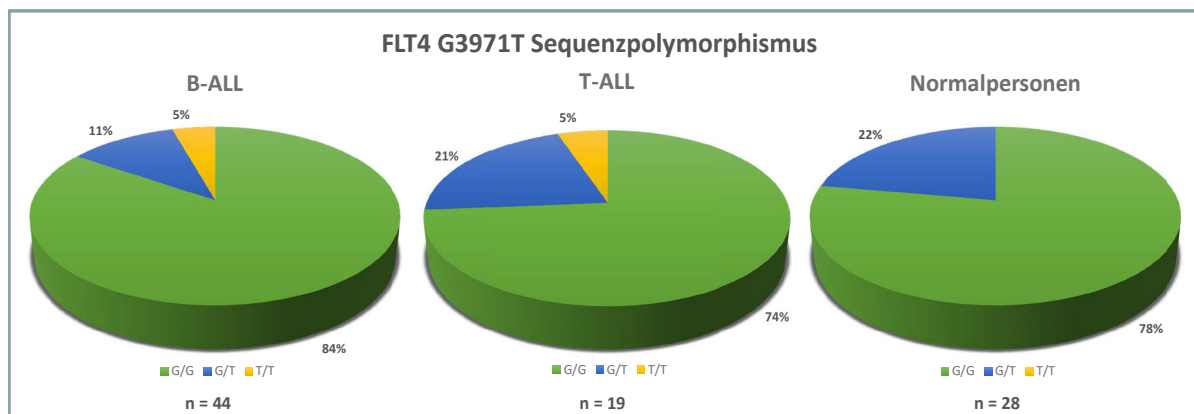


**Abbildung 3-29: FLT4 G3971T Sequenzpolymorphismus (rs307821): Sequenzierungsergebnisse der genomischen DNA**

Die Frequenz dieses Polymorphismus innerhalb der ALL- und Kontrollgruppe wurde mittels *high resolution melt* (HRM)-Analyse untersucht. Die HRM-Analyse erlaubte aufgrund des durch den *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) veränderten Schmelzpunkt eine eindeutige Unterscheidung der homozygoten und heterozygoten Mutation vom Wildtyp. Die Spezifität der Schmelzkurvenanalyse wurde über sequenzierte Stichproben bestätigt.



**Abbildung 3-30: Schmelzkurvenanalyse FLT4 G3971T Sequenzpolymorphismus**

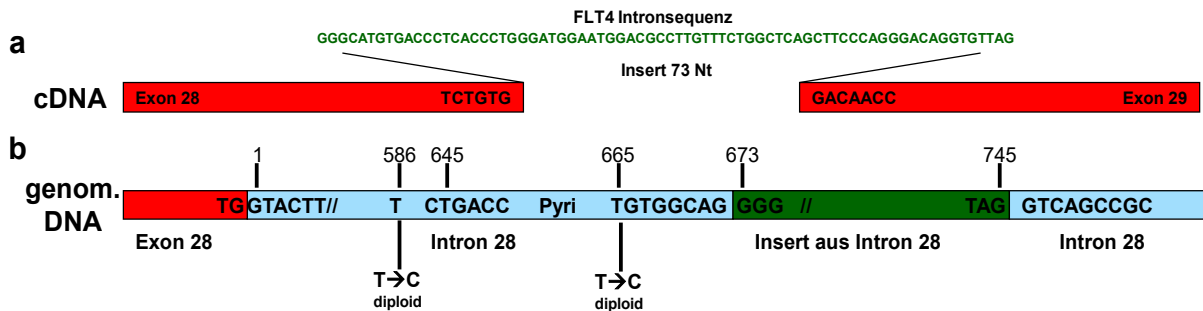


**Abbildung 3-31: Verteilung des FLT4 G3971T Sequenzpolymorphismus (rs307821) in B-ALL, T-ALL und Normalpersonen**

Von den 19 analysierten T-ALL Proben wiesen vier Patienten eine heterozygote und ein Patient einen homozygoten Polymorphismus auf. Die 44 B-ALL-Proben zeigten zu 11 % die R1324L Veränderung heterozygot und zu 5 % homozygot. In den 28 Kontrollen zeigten 22 % eine heterozygote Mutation. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

### 3.4.1.1.3 Kryptisches Exon innerhalb der FLT4-CTD-Domäne

Die Sequenzierung der FLT4 cDNA detektierte in einer Probe innerhalb der C-terminalen Domäne ein 73 bp großes kryptisches Exon zwischen Exon 28 und 29. In diesem Abschnitt der genomischen Intron 28-Sequenz sind die für das Spleißen benötigte Nukleinsäuresequenzen größtenteils vorhanden.

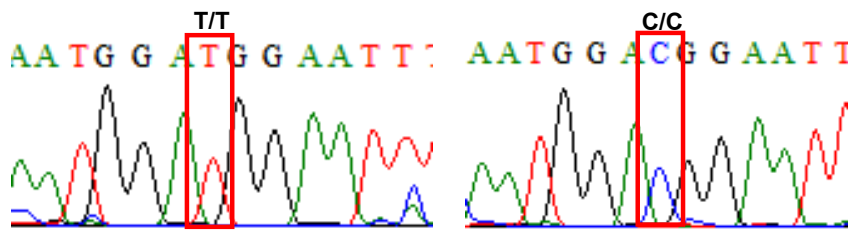


**Abbildung 3-32: a: cDNA-Sequenz mit kryptischem Exon (grün)**  
**b: genomische Sequenz des Intron 28 (Exon; Intron; kryptisches Exon)**

Die Sequenzierung der genomischen DNA ergab zwei Punktmutationen innerhalb des Introns, welche zum ungewöhnlichen Spleißen dieser Probe beitragen könnten. Durch die Insertion des kryptischen Exons kommt es zu einer Leserahmenverschiebung, welche für 42 abweichende Aminosäuren kodiert, gefolgt von einem vorzeitigen Stopcodon. Infolgedessen fehlen am C-Terminus 138 Aminosäuren.

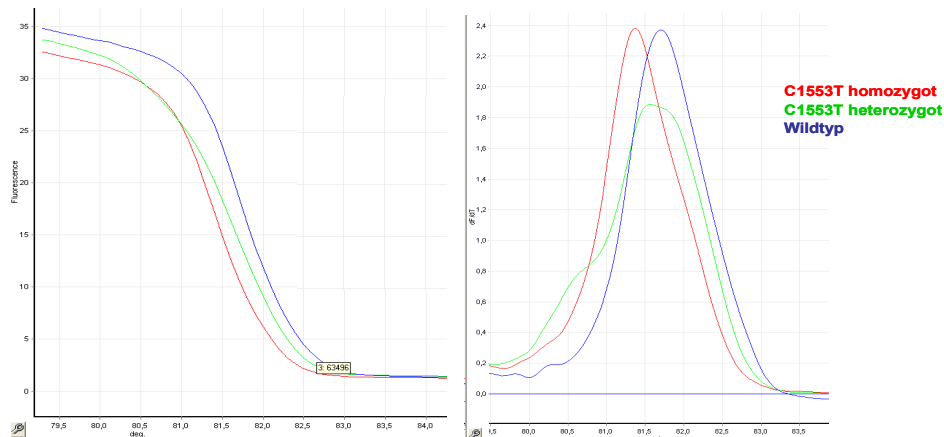
### 3.4.1.2 ROR1 Sequenzanalyse

In der Tyrosinkinase ROR1 wurden in vier der sieben sequenzierten Stichproben der C1553T Polymorphismus festgestellt, welche zu einem Austausch der Aminosäure 518 Threonin gegen Methionin führt. Die Häufigkeit dieses Polymorphismus bei ALL-Patienten wurde über HRM-Analyse ermittelt.

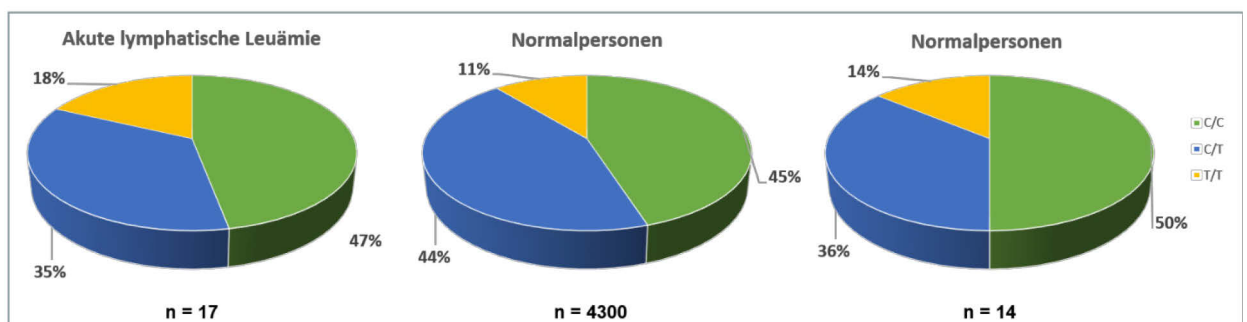


**Abbildung 3-33: ROR1 C1553T Sequenzpolymorphismus (rs7527017):**  
**Sequenzierungsergebnisse der genomischen DNA**

Die HRM-Analyse des Sequenzpolymorphismus C1553T der Tyrosinkinase ROR1 wurde in allen 17 ALL-Patienten mit starker ROR1-Expression und in 14 Normalpersonen durchgeführt. Die Schmelzkurven-Analyse erlaubte eine eindeutige Unterscheidung des heterozygot oder homozygot mutierten ROR1-Gens vom Wildtyp-Gen. Die Spezifität dieser Methode wurde über Sequenzierungen bestätigt.



**Abbildung 3-34: Schmelzkurvenanalyse des ROR1 C1553T Sequenzpolymorphismus**

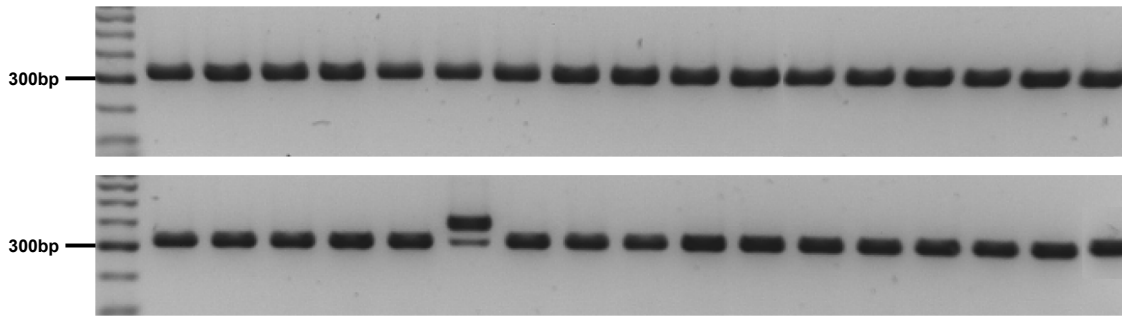


**Abbildung 3-35: Verteilung des ROR1 C1553T Sequenzpolymorphismus (rs7527017) in ALL-Patienten und Normalpersonen**

Zusätzlich zu der hier untersuchten Stichprobe von 14 Kontrollen sind die Ergebnisse des NHLBI Exomsequenzierungsprojekts [5] von 4300 europäischen Amerikanern dargestellt. Diese ergab, dass der SNP rs7527017 heterozygot zu 44 % und homozygot zu 11 % ausgeprägt ist. Die hier untersuchten Normalpersonen zeigten eine ähnliche Verteilung dieser Genvariante. In den 17 ALL-Proben war der Polymorphismus homozygot zu 18 % und heterozygot zu 35 % manifestiert, 47 % wiesen den Wildtyp auf.

### 3.4.1.3 FLT3-ITD akuter B-lymphatischer Leukämien

Die interne tandem Duplikation (ITD) innerhalb der Juxtamembran-Domäne von *FLT3* ist eine mit ca. 20 %iger Frequenz auftretende sehr häufige Mutation in der akuten myeloischen Leukämie. In seltenen Fällen ist diese Mutation auch für B-ALL beschrieben.



**Abbildung 3-36: FLT3-ITD Analyse der genomischen DNA von B-ALL-Proben**

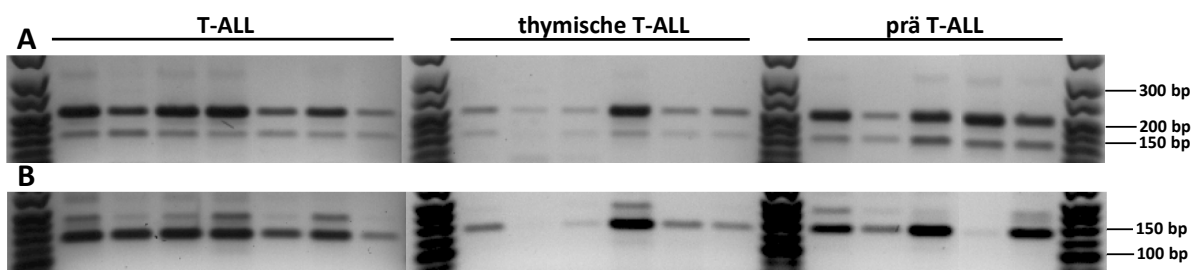
Von den 34 B-ALL Proben wies nur eine prä B-ALL diesen Längenpolymorphismus auf. Diese Probe zeigte keine immunologisch auffällige Antigenexpression und eine nur schwache Expression des myeloischen Markers CD33.

### 3.4.2 Spleißvarianten

#### 3.4.2.1 *ERBB4* Spleißvarianten

*ERBB4* kann in vier verschiedenen Isoformen vorliegen. Diese unterscheiden sich durch das Vorhandensein von Exon 26 (CYT1-Isoform mit Exon 26; CYT2-Isoform ohne Exon 26) und im Exon 16 (JmA-Isoform mit Exon 16; JmB-Isoform mit alternativen Exon 16).

Über eine PCR mit Primern im Exon 25 und Exon 27 wurde der Anteil der vorliegenden CYT-Isoformen in T-ALL Patienten mit hoher *ERBB4*-Expression bestimmt. Eine Multiplex PCR mit Primern im Exon 16 der JmA-Isoform oder im alternativen Exon 16 der JmB-Isoform wurde zur Unterscheidung der Spleißvarianten JmA und JmB eingesetzt. Da Normalpersonen *ERBB4* nicht oder nur gering exprimieren, konnte kein Vergleich der vorliegenden Spleißvarianten mit diesen erfolgen.



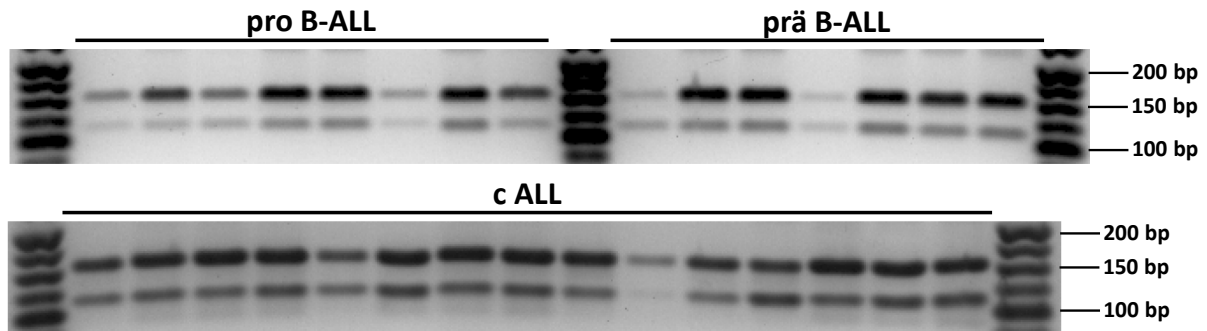
**Abbildung 3-37: PCR *ERBB4*-Spleißvarianten A:** *ERBB4*-Spleißvarianten CYT1 (201 bp) und CYT2 (153 bp) **B:** *ERBB4*-Spleißvarianten JmA (143 bp) und JmB (105 bp)

Die PCR der *ERBB4*-CYT1-Isoform ergab ein Produkt von 201 bp, die PCR der *ERBB4*-CYT2-Isoform eines von 153 bp. In den meisten Proben wurde hauptsächlich das größere PCR-Produkt der *ERBB4*-CYT1-Isoform amplifiziert, aber auch die kleinere CYT2-Isoform konnte nachgewiesen werden.

Die PCR der *ERBB4*-JmA-Isoform ergab ein 143 bp großes Produkt. Das PCR-Produkt der JmB-Isoform mit 105 bp wurde nicht exprimiert.

### 3.4.2.2 *EPHA7* Spleißvarianten

*EPHA7* wird in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert: ein Volllängetranskript *EPHA7-FL* und die verkürzten, katalytisch inaktive Isoform *EPHA7-S*. Dabei führt das alternative Exon 7 zur vorzeitigen Termination der Transkription. Der Nachweis der Isoformen erfolgte über eine Multiplex-PCR mit Primern im Exon 7 der FL-Variante und im alternativen Exon 7 der *EPHA7-S*-Isoform. Da Normalpersonen *EPHA7* nicht exprimieren, konnte kein Vergleich der vorliegenden Spleißvarianten mit diesen erfolgen.

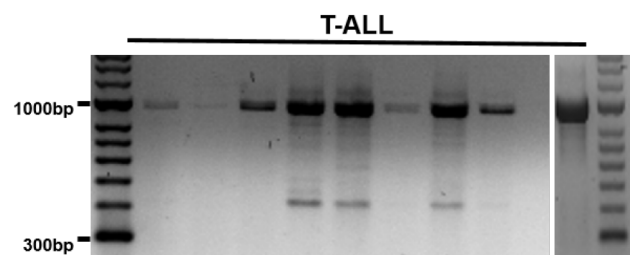


**Abbildung 3-38: PCR *EPHA7*-Spleißvarianten:** *EPHA7-FL* (155 bp) und *EPHA7-S* (116 bp)

Die PCR von *EPHA7-S* ergab ein 116 bp, die von *EPHA7-FL* ein 155 bp großes PCR-Produkt. In den meisten Proben wurde hier vorwiegend das 155 bp große PCR-Produkt der *EPHA7-FL*-Isoform amplifiziert.

### 3.4.2.3 *NTRK3* Spleißvarianten

*NTRK3* liegt in zwei verschiedene Isoformen vor: der katalytisch aktive Volllänge-Form und in einer verkürzten, inaktiven Isoform. Über PCR der Tyrosinkinase-Domäne von *NTRK3* wurden die in der T-ALL vorliegenden Isoformen bestimmt. Da Normalpersonen keine *NTRK3*-Expression aufweisen, konnte auch hier kein Vergleich der vorliegenden Spleißvarianten mit diesen erfolgen.

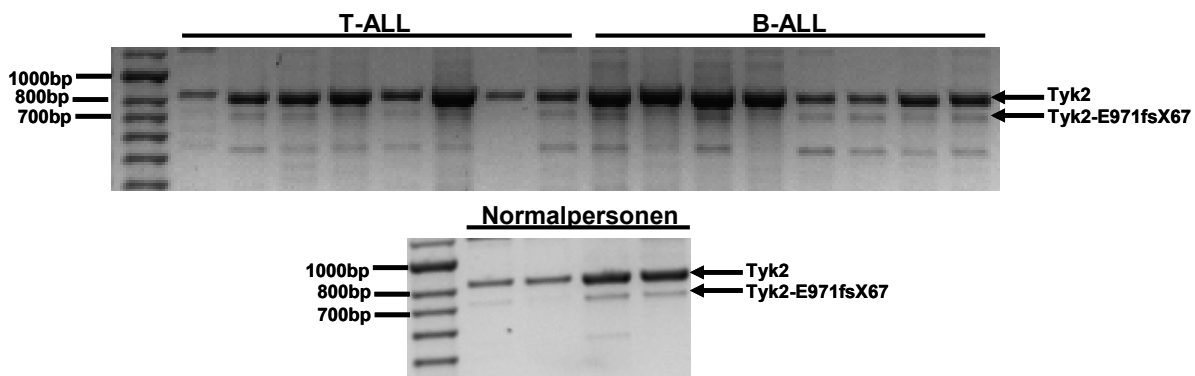


**Abbildung 3-39: PCR *NTRK3*-Spleißvarianten:** *NTRK3*-Volllänge Isoform (1000 bp) und inaktive *NTRK3*-Isoform (499 bp) von T-ALL-Patienten

In den cDNA-Proben von T-ALL-Patienten lag hauptsächlich das ungespleißte, katalytisch aktive 1000 bp große Produkt vor. In geringeren Mengen wurde zudem in vielen Proben ein 499 bp großes PCR-Produkt amplifiziert, welches dem inaktiven Spleißprodukt mit fehlenden Exons 13-15 entspricht.

#### 3.4.2.4 Tyk2-E971fsX67 Isoform

TYK2 ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase der JAK-Familie, welche von gesunden B- und T-Zellen sehr stark exprimiert wird und dessen Expression in den untersuchten ALL-Proben nochmals verdoppelt war. Diese Tyrosinkinase spielt eine unerlässliche Rolle bei der Weiterleitung multipler Zytokinsignale der angeborenen und erworbenen Immunität (Minegishi et al., 2006). Das Fehlen des Exon 19 in der Spleißvariante TYK2 E971fsX67 führt zu einer Leserahmenverschiebung (fs: *frameshift*) ausgehend vom Glutamin E971 mit Translation 66 alternativer Aminosäuren, gefolgt von einem frühzeitigen Stopcodon (X67). Die Veränderung des Leserahmens mit vorzeitiger Termination der Kinase-Domäne führt zur Deletion von 206 Aminosäuren des katalytischen Zentrums und der Aktivierungsschleife. Daher ist diese Isoform wahrscheinlich mit einer katalytischen Inaktivierung assoziiert. Die TYK2 E971fsX67 Spleißvariante wurde in verschiedenen malignen Zellen identifiziert und könnte als prognostischer Marker dienen (Ruhe et al., 2007).



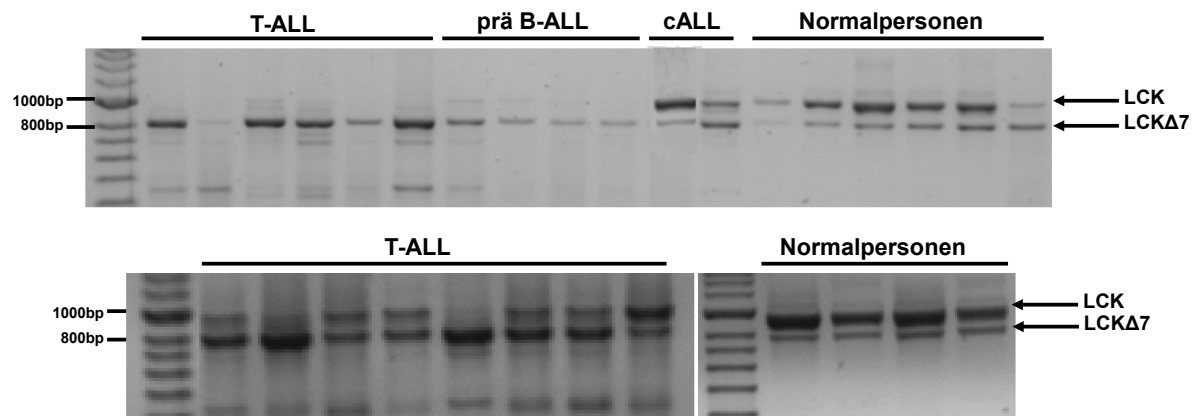
**Abbildung 3-40: PCR *TYK2*-Spleißvarianten:** *TYK2* Volllänge-Isoform (840 bp) und *TYK2*-E971fsX67 (720 bp) von ALL- und Kontrollproben

Sowohl in den ALL-Proben, als auch in den Kontrollen dominierte das aktive Volllängetranskript mit einer Größe von 840 bp. In vielen ALL- und Kontrollproben konnte die Tyk2-E971fsX67 Variante, welche dem 720 bp großem PCR-Produkt entsprach, in geringen Mengen nachgewiesen werden.

#### 3.4.2.5 LCKΔ7 Spleißvariante

Die *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* LCK ist eine sehr stark exprimierte zytoplasmatische Proteinkinase der SRC-Familie, welche eine entscheidende Rolle in der T-Lymphozyten Aktivierung und der thymozytischen Entwicklung spielt (Salmond et al., 2009). Durch alternatives Spleißen des Exon 7 werden in der LCKΔ7-Isoform die ersten 51 Aminosäuren der Tyrosinkinase-Domäne nicht transkribiert. Die dadurch bedingte Reduktion der enzymatischen Aktivität führt in Jurkat-Zellen zu einer verlangsamten Zellteilung und die LCKΔ7-Isoform wirkt dort als Regulator der Volllänge-Isoform (Germani et al., 2003). Die LCK-Expression der Kontrollzellen war sehr hoch und in T-ALL-Proben nochmals durchschnittlich um das Zwölfwache verstärkt.





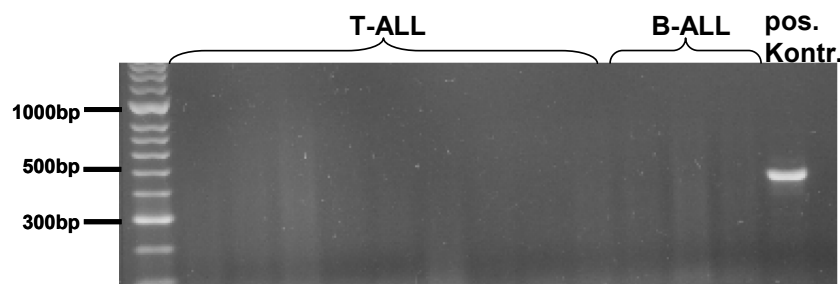
**Abbildung 3-41: PCR *LCK*-Spleißvarianten:** *LCK*-Volllänge Isoform (950 bp) und *LCKΔ7*-Isoform (800 bp) in ALL- und Kontrollproben

Das 950 bp große PCR-Produkt entspricht dem ungespleißten Volllänge-PCR-Produkt, das 800 bp PCR-Produkt der *LCKΔ7*-Isoform. Dies wurde durch Sequenzierung bestätigt. In den T-ALL und prä B-ALL Proben lag hauptsächlich die *LCKΔ7*-Isoform vor, während die Kontrollgruppe überwiegend die ungespleißte Isoform von *LCK* exprimierte.

### 3.4.3 Translokationen

#### 3.4.3.1 NUP214-ABL1 Translokation

Eine *ABL1*-Überexpression aufgrund der Translokation des *ABL1*-Gens zum *NUP214*-Gen (Graux et al., 2004) wurde mittels Multiplex-PCR überprüft. Es wurden neun T-ALL- und drei B-ALL-Proben untersucht, welche *ABL1* sehr stark exprimierten. Als positive Kontrolle diente die cDNA der Leukämie-Zelllinie ALL-SIL.



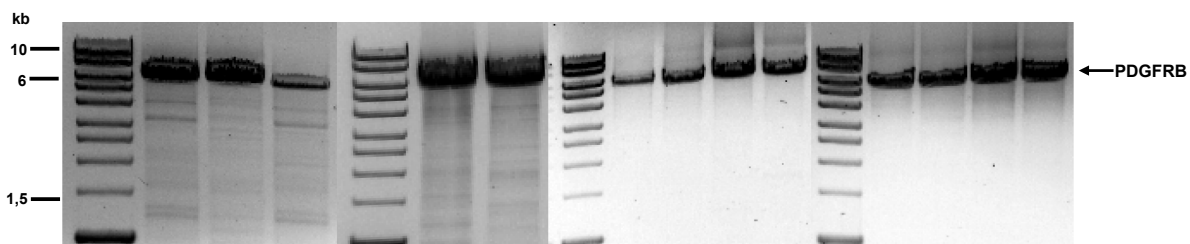
**Abbildung 3-42: *NUP214-ABL1* PCR in *ABL1* überexprimierenden ALL-Proben**

Es konnten keine *NUP214-ABL1*-Translokationen nachgewiesen werden.

#### 3.4.3.2 Langstrecken-inverse (LDI) PCR *PDGFRB*

*PDGFRB* wurde als Translokationspartner verschiedener Gene in Leukämien beschrieben, z.B. in der Fusion mit den Genen *EBF1*, *ETV6* (Roberts et al., 2012) oder *TEL* in der CML (Toffalini et al., 2010).

Mittels der Langstrecken-inversen PCR (*Long Distance Inverse PCR*: LDI-PCR) können unbekannte Translokationen nachgewiesen werden. Die LDI-PCR basiert auf dem Einsatz verschiedener Restriktionsenzyme, Zirkularisierung der geschnittenen genomischen DNA und einer darauffolgenden PCR. Die PCR startete an einem bekannten Genabschnitt des *PDGFRB*-Gens in der Nähe der potenziellen Bruchstelle und amplifiziert davon ausgehend die zirkularisierte DNA. Liegt keine Translokation vor, wird ein PCR-Produkt bekannter Größe gebildet, ist hingegen eine Translokation vorhanden, schneiden die Restriktionsenzyme an abweichenden DNA-Abschnitten, so dass meist ein PCR-Produkt anderer Größe entsteht. ALL-Proben mit starker *PDGFRB*-Expression wurden mittels des Restriktionsenzymes *KpnI* und LDI-PCR auf Translokationen untersucht.

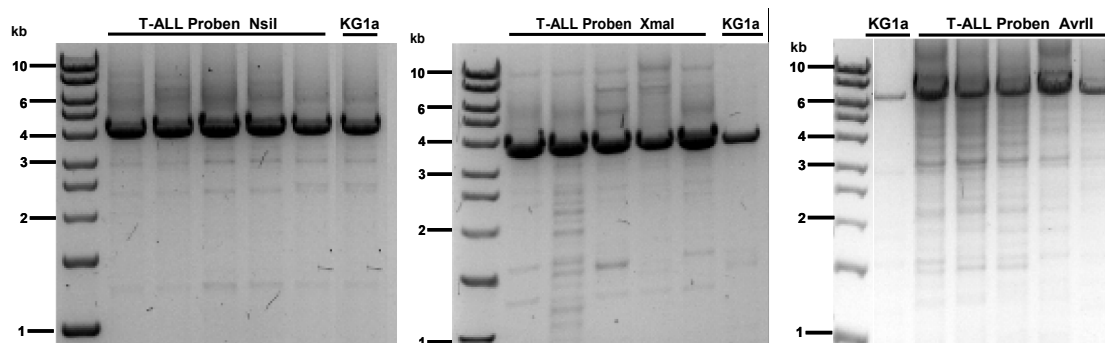


**Abbildung 3-43: *PDGFRB* LDI-PCR in *PDGFRB* überexprimierenden ALL-Proben**

Die LDI-PCR des unveränderten *PDGFRB*-Gens erzeugte ein PCR-Produkt mit einer Länge von 6091 bp. In den 13 untersuchten ALL-Proben konnten nur dieses PCR-Produkt nachgewiesen werden.

### 3.4.3.3 Langstrecken-inverse (LDI) PCR *FGFR1*

*FGFR1*-Translokationen zu verschiedenen Partnern wurden in unterschiedlichen Leukämien beschrieben (Sohal et al., 2001; Trimaldi et al., 2013). Beispielsweise ist das Wachstum der AML-Zelllinie KG1a von der *FGFR1OP2-FGFR1* Fusion abhängig (Gu et al., 2006). *FGFR1* lag in 30 % der B- und 80 % der T-ALL-Proben überexprimiert vor, mittels LDI-PCR wurden Proben mit starker *FGFR1*-Expression auf Translokationen untersucht. Dazu wurden in drei verschiedene Ansätze die Restriktionsenzyme *XmaI*, *NsiI* und *AvrII* verwendet. Als positiv Kontrolle wurde genomische KG1a DNA eingesetzt.



**Abbildung 3-44: *FGFR1* LDI-PCR in *FGFR1* überexprimierenden T-ALL Proben**

Die LDI-PCRs der fünf T-ALL Proben amplifizierten keine von den Kontrollbanden abweichenden PCR-Produkte. Das PCR-Produkt der *FGFR1OP2-FGFR1*-Translokation von KG1a wäre im Falle des XmaI-Verdau mindestens 12 kb und beim AvrII-Verdau bei mindestens 9 kb groß. Daher wird in diesen Ansätzen nur die kleinere Kontrollbande amplifiziert.



## 4 DISKUSSION

### 4.1 Expressionsanalyse

Zur Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene stehen die Methoden der quantitativen RT-PCR (qPCR), Microarrays und RNA-Sequenzierungen (RNA-SEQ) zur Verfügung. Microarrays decken einen dynamischen Umfang von nur etwa  $3,6 \times 10^3$  ab und erlauben keine Detektion von Expressionsunterschieden bei sehr hoher und sehr geringer Genexpression. Darüber hinaus kommt es immer wieder zu *cross hybridisations* mit ähnlichen Transkripten, was die Unterscheidung nah verwandter Gene mit Sequenzhomologien erschwert. Auch das Hintergrundrauschen durch unspezifische Hybridisierungen stellt ein Problem dar. RNA-SEQ ermöglicht die Sequenzierung und Quantifizierung aller mRNA-Produkte. Somit können zeitgleich zur Quantifizierung auch Sequenzvariationen, Translokationen und verschiedene Isoformen bestimmt werden. Diese Methode war zum Zeitpunkt der Analysen für große Probenzahlen nicht möglich. Die quantitative RT-PCR ist eine sehr sensitive Methode um die Expression einer begrenzten Anzahl von Genen für viele Proben zu bestimmen und deckt einen dynamischen Bereich von etwa  $5 \times 10^6$  ab. Die Expressionsanalyse über TaqMan-Sonden ist ein erprobtes Mittel zur Quantifizierung der mRNA-Mengen und die hohe Spezifität ermöglicht eine Unterscheidung nah verwandter Gene. Eine Analyse der Expression aller Tyrosinkinasen in adulter akuter lymphatischer ALL wurde bisher noch nicht durchgeführt. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in Tabelle 3-4 und Abbildung 9-1 zusammengefasst dargestellt.

Entscheidend für die Quantifizierung der mRNA ist die Qualität von RNA und cDNA. Der Zeitraum zwischen Probenentnahme und RNA-Aufreinigung sowie Unterschiede in der Lagerung beeinflusst die Qualität der RNA und damit der cDNA sehr stark. Diese Fehlerquelle wurde über eine Normierung mittels zweier Referenzgene verringert. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde sowohl über Wiederholungen mit demselben Patientenmaterial, als auch über qPCRs mit alternativen Primern und Sonden im *Rotor-Gene* Cyclor überprüft. Auch die geringen Abweichungen von 0,2 - 0,5 Ct-Werten zwischen den Duplikaten und die Homogenität des Expressionsmusters innerhalb der ALL-Gruppe und der Normalpersonen bestätigen die Qualität und Verlässlichkeit der Ergebnisse.

Die Zuverlässigkeit dieser Analyse wird auch durch Untersuchungen anderer Forschungsgruppen, welche für einzelne TK zu ähnlichen Ergebnissen kamen, bestätigt. Beispielsweise wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von *PTK2* (Ozkal et al., 2009) und *DDR1* (Chiaretti et al., 2005) festgestellt und auf Proteinebene konnte die Expression und Aktivierung von ZAP70 (Guillaume et al., 2005), PTK7 (Jiang et al., 2012) und SRC (Vázquez-Franco et al., 2012) nachgewiesen werden.

Post-Transkriptionelle Regulationsmechanismen, beispielsweise über mRNA-Prozessierungen und mRNA-Degeneration oder die Halbwertszeit und der Aktivitätszustand der Tyrosinkinasen wurden nicht erfasst. Eine Darstellung der Expression auf Proteinebene via Western-Blot gelang nicht, da die zu den untersuchten Patienten gehörenden Proteinlysate größtenteils degradiert waren und/oder die verwendeten Antikörper keine spezifische Detektion ermöglichten. Für die weitere Diskussion wurde von einer Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Expression ausgegangen.

Bei einer niedrigen Expression in dem Größenbereich von  $2^{-\text{Dct}} = 1 \times 10^{-3} - 8 \times 10^{-5}$  wurden aufgrund zunehmender Fehleranfälligkeit der Analyse und der unsicheren biologischen Relevanz nur TK mit einem signifikanten Expressionsunterschied von  $p < 0,0001$  näher betrachtet. Liegt hingegen eine sehr starke Expression von  $2^{-\text{Dct}} \geq 5 \times 10^{-2} - 10^0$  vor, sind auch geringe Expressionsunterschiede von Bedeutung.

In gesunden Personen wird die TK-Expression von Alter und Geschlecht beeinflusst. In der Clusteranalyse der Kontrollgruppe zeigten alle weiblichen Proben ein ähnliches Expressionsprofil, auch wurden die Proben älterer Personen (> 70 Jahre) separat gruppiert. Im Gegensatz zur Normalpopulation nehmen Alter und Geschlecht hingegen keinen Einfluss auf das TK-Expressionsprofil von ALL-Patienten.

Sowohl in B- als auch in T-ALL wiesen insbesondere die Gene zytoplasmatischer Tyrosinkinasen der JAK-, SRC und FAK-Familie ein sehr hohes Expressionsniveau auf. Auch in Normalpersonen waren diese oftmals stark exprimiert. Zudem wurden viele der für Angiogenese und Lymphangiogenese wichtigen VEGF-Rezeptoren hoch exprimiert. Eine verstärkte Aktivierung dieser hat großen Einfluss auf verschiedene Signalwege und eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Der überwiegende Teil der Tyrosinkinasen zeigte in ALL ein anderes Expressionsprofil als in Normalpersonen. In der B-Linien ALL waren besonders die Gene *ABL1*, *BLK*, *DDR1*, *EPHA7*, *FLT1*, *FLT3*, *FLT4*, *PTK2*, *PTK2B* und *PTK7* stark überexprimiert und die Gene *AATK*, *BMX*, *DDR2*, *FGR*, *HCK*, *KDR*, *KIT* und *RET* verringert exprimiert. In der T-Linien ALL waren die Gene *ABL1*, *EPHB6*, *ERBB4*, *FLT1*, *LCK*, *NTRK3*, *PTK7*, *TEC*, *YES1* und *ZAP70* stärker exprimiert und eine verringerte Expression wiesen die Gene *DDR2*, *EPHB3*, *FGR*, *HCK*, *KDR* und *PTK2* auf.

Die Patientendaten des Langzeitüberlebens lagen nicht vor. Folglich konnten keine Aussagen bezüglich TK-Expression und Rezidivrisiko oder Langzeit-Überleben getroffen werden. Die Bedeutung von Tyrosinkinasen als prognostische Marker müsste an einem größeren Patientenkollektiv prospektiv unter Kenntnis von Überlebensdaten sowie Therapieansprechen bewertet werden.

## **4.2 Expressionsanalyse des Tyrosin-Kinoms von Stammzellen, B-lymphatischen und T-lymphatischen Zellen**

Die Expression der Tyrosinkinassen *BLK*, *BMX*, *CSF1R*, *EPHA1*, *EPHA4*, *FLT3*, *FLT4*, *ITK*, *KIT*, *LCK*, *MERTK*, *PTK7*, *TEC*, *TEK*, *TIE1* und *ZAP70* zeigte zwischen gesunden CD19+ B-Zellen, CD3+ T-Zellen und CD34+ Stammzellen deutliche Unterschiede. Tyrosinkinassen mit spezifischer und ausreichend starker Expression können als Marker für die Zuordnung zur B- oder T-lymphoiden Reihe oder als Stammzellmarker dienen. Rezeptor-Tyrosinkinassen eignen sich besonders gut als potentielle immunologische Marker, da diese an der Oberfläche der Zellen lokalisiert sind und so ohne Aufschluss der Zellen über Antikörper nachgewiesen werden können. Es konnte die bereits bekannte B-zellspezifische Expression der *B-lymphoid Kinase (BLK)* (Dymecki et al., 1990) und die stammzelltypische Expression von *KIT* und *FLT3*, welche als Stammzell- sowie als AML-Marker eingesetzt wird (Edling and Hallberg, 2007; Gilliland and Griffin, 2002), bestätigt werden. Die Tyrosinkinassen *MERTK*, *PTK7*, *TEC*, *TEK* und *TIE1*, die zelltypspezifisch nur von CD34+ Stammzellen sehr hoch exprimiert wurden sowie *CSF1R*, *FLT4*, *ITK*, *LCK* und *ZAP70*, nur von CD3+ T-Zellen hoch exprimiert, sind bisher nicht als Marker beschrieben und könnten in weiteren Untersuchungen mittels Antikörperfärbung und FACS-Analysen auf ihre zelltypspezifische Expression überprüft werden.

Die Tyrosinkinassen *FGFR4*, *FLT3*, *PTK7*, *SRC*, *TEC* und *TYRO3* wurden von Stammzellen deutlich stärker exprimiert als von reifen lymphatischen Zellen. Diese TK wiesen in leukämischen ALL-Zellen ebenfalls ein ähnlich hohes Expressionsniveau auf. Eventuell vermitteln diese Tyrosinkinassen leukämischen Zellen Stammzeleigenschaften, wie ein hohes Proliferationsvermögen oder einen Differenzierungsstop. Eine im Vergleich zu den ausgereiften Zellen verringerte Expression in Stamm- und ALL-Zellen war in dem *EGFR*-Gen feststellbar.

## **4.3 Clusteranalyse**

Die Clusteranalyse des TK-Expressionsmusters erlaubte eine Zuordnung der Proben zur B- oder T-Zell-ALL, eine weitere Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Reifegraden der Leukämien (pro, common oder prä B-ALL und prä, thymische oder reife T-ALL) ist nur für thymische T-ALLs möglich.

Eine Zuordnung der akuten Leukämie zur B- oder T-Zell Reihe ermöglichen insbesondere die verschiedenen Expressionen der Tyrosinkinassen *EPHA7*, *PTK2*, *NTRK3*, *ERBB4* und *ZAP70*. Diese spezifisch in der B-ALL oder T-ALL stark exprimierten Gene könnten als Leukämiemarkers verwendet werden. Neue Marker helfen neben Erstellung der richtigen Diagnose auch bei der Detektion minimaler Resterkrankungen und ermöglichen so eine

angepasste Risikostratifizierung und eine dazu passende Therapie. *EPHA7* und *PTK2* könnten als diagnostische Marker für B-Linien ALL und *NTRK3*, *ERBB4* und *ZAP70* als Marker für T-Linien ALL dienen. In Folgestudien an größeren Patientenkollektiven verschiedener Leukämien sollte über Antikörperfärbungen und Flow-Cytometrie die B- oder T-ALL-spezifische Expression verifiziert werden.

Sieben der acht untersuchten thymischen Leukämien zeigten ein spezifisches Expressionsmuster, welches sich von denen der meisten anderen T-ALL Proben unterschied. Diese thymischen T-ALLs wiesen im Vergleich zu den reifen und prä T-ALLs eine geringere Expression der Tyrosinkinase-Gene *BTK*, *LYN*, *MATK*, *INSRR*, *FLT4* und *NTRK1* und eine stärkere Expression des *FER*-Gens auf. Eventuell trägt diese geringere Expression von Tyrosinkinasen zu der vergleichsweise günstigen Prognose thymischer ALLs (Gökbuget et al., 2012) bei.

Anhand des Expressionsprofils ließ sich der thymische Subtyp aber nicht exakt definieren, da einzelne T-ALL Proben ebenfalls eine ähnliche Expression zeigten. Die nicht zu den thymischen ALLs gruppierte thymische T-ALL Probe hatte einen vergleichsweise niedrigen Blastenanteil. Der höhere Anteil an gesunden Zellen könnte das Expressionsergebnis beeinflusst haben.

Die meisten der untersuchten Proben zeigten eine sehr ähnliche TK-Expression, welches keine weitere Unterteilung ermöglichte. Daher können, mit Ausnahme der thymischen T-ALLs, aus dem Reifegrad einer akuten lymphatischen Leukämie keine zusätzlichen Informationen über die TK-Expression gewonnen werden.

### **4.4 Expressionsanalyse des Tyrosin-Kinoms adulter ALL-Patienten**

Neben den in Kapitel 4.4.1 - 4.4.3 genauer besprochenen hoch exprimierten Tyrosinkinasen, zeigten auch die Tyrosinkinasen *FGFR4*, *SRC*, *TEC*, *IGF1R* und *TYRO3* in fast allen untersuchten leukämischen Zellen, *BLK*, *DDR1*, *EPHB4*, *LTK* und *INSR* in B-lymphatischen sowie *YES1* und *ZAP70* in T-lymphatischen Leukämiezellen, eine erhöhte Expression.

Viele der im Folgenden kurz diskutierten überexprimierten Tyrosinkinasen bewirken eine Proliferationssteigerung über den MAPK- und/oder JAK/STAT-Signalweg und inhibieren die Apoptose über den PI3/AKT-Signalweg.

**FGFR4** spielt eine Rolle bei Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Migration, hat Einfluss auf die Tumorphiliferation und das metastatische Potential (Taylor et al., 2009). Alle hier untersuchten ALL-Proben zeigten eine durchschnittlich um das 9-fache verstärkte *FGFR4*-Expression, welche bisher noch nicht beschrieben wurde. Über die Aktivierung von STAT3 könnte FGFR4 Einfluss auf die Proliferation nehmen. Eine Inhibition ist über



spezifische Inhibitoren der FGFR-Familie möglich. Diese würden zwar hauptsächlich FGFR1 inhibieren, dessen Expression um das 10 – 100-fache höher lag als die von FGFR4, die gleichzeitige Inhibition von FGFR4 könnte deren Wirksamkeit jedoch verstärken.

Die **SRC**-Kinase ist in vielen malignen Erkrankungen dysreguliert und beeinflusst Proliferation, Zellüberleben, Adhäsion, Migration, Invasion und Metastasierung multipler Tumorentitäten. SRC transduziert Überlebenssignalen zu nachgeschalteten Effektoren, wie PI3K, AKT und STAT3. Es fördert über Dissoziation von Zell-Zell-Adhäsionsverbindungen die Zellmobilität und steigert die Zelladhäsion zur extrazellulären Matrix (Kim et al., 2009; Playford and Schaller, 2004; Yeatman, 2004). SRC wies in der adulten ALL eine um etwa das 4-fache verstärkte Expression auf und liegt nach Ergebnissen von *Vázquez-Franco et al.* aktiviert vor (Vázquez-Franco et al., 2012). Wahrscheinlich ist diese starke SRC-Expression für Erhaltung der hohen Proliferationsraten wichtig. Eine SRC-Inhibition ist beispielsweise über Dasatinib und Bosutinib oder die in klinischer Testungen befindlichen Inhibitoren Saracatinib und KX01 möglich (Creedon and Brunton, 2012).

Die zytoplasmatische Tyrosinkinase **TEC** ist sowohl in der B- als auch T-Lymphozyten-Aktivierung und -Entwicklung involviert. Sowohl in B- als auch T-ALL-Patienten war eine **TEC**-Überexpression bei sehr hohen Expression festzustellen. TEC ist in die B-Zell-Entwicklung und -Aktivierung involviert (Kitanaka et al., 1998) und ist ein integraler Bestandteil der T-Zell-Rezeptor-Signalkaskade (Yang et al., 2001). Aufgrund dieser Eigenschaften und da TEC auch von Stammzellen stark exprimiert wird, könnte die hohe **TEC**-Expression die Differenzierung beeinflussen und so an der Leukämieentstehung beteiligt sein. Eine Inhibition der TEC-Kinase kann beispielsweise über Dasatinib erfolgen oder über Inhibitoren der TEC-Familie (John S Jarboe, 2012).

**TYRO3** ist an der negativen Regulation der Immunantwort beteiligt, kann Überlebenssignalwege aktivieren, Apoptose verhindern und/oder die Proliferation stimulieren (Rothlin et al., 2015). Die Fähigkeit zur onkogenen Transformation wird u.a. über Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs vermittelt (Lan et al., 2000). **TYRO3** wurde in den untersuchten akut lymphatischen Leukämieproben zwar im Durchschnitt um das 5 – 7-fache stärker exprimiert, die Expression ist aber immer noch vergleichsweise niedrig. Analog zu den Ergebnissen bei **TYRO3**-überexprimierenden Schilddrüsenkarzinomen (Avilla et al., 2011) und Melanomzellen (Demarest et al., 2013), könnte **TYRO3** auch in ALL mit einer gesteigerten Apoptoseresistenz assoziiert sein. Da die Expression in ALL aber relativ niedrig ist, ist zweifelhaft ob eine Inhibition dieser RTK entscheidend zur Therapie beitragen könnte.

Die B-lymphatische Kinase (**BLK**) wird vor allem von B-lymphatischen Zellen exprimiert und ist an der Proliferationskontrolle während der B-Zell-Entwicklung beteiligt (Dymecki et al., 1990). BLK beeinflusst den Signalweg des pre-B-Zellrezeptors, welcher eine zentrale Rolle in

der B-Zellentwicklung innehat und die Differenzierung von pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen kontrolliert. Konstitutiv aktive BLK-Mutanten lösen die Proliferation von B-Vorläuferzellen aus (Tretter et al., 2003), wirken wachstumsfördernd auf lymphatische Zellen und können die IL2-Abhängigkeit von BaF3-Zellen überwinden (Petersen et al., 2014). Andere Untersuchungen hingegen belegen einen BLK vermittelten Wachstumsarrest und Apoptoseinduktion in leukämischen Stammzellen mit BCR-ABL-Translokation (Zhang et al., 2012). Hier konnte eine sehr hohe *BLK*-Expression in B-lymphatischen Leukämiezellen und gesunden CD19+ B-Zellen nachgewiesen werden. Da BLK nur von B-lymphatischen Zellen exprimiert wird, wäre eine spezifische Inhibition von diesem vielversprechend und sollte vergleichsweise geringe Nebenwirkungen haben. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ist bisher aber nur eine Inhibition aller SFKs gleichzeitig möglich.

**DDR1** ist an der Regulation grundlegender Mechanismen, wie Zellpolarität, Gewebemorphogenese und Zelldifferenzierung beteiligt. Eine wichtige Aufgabe von DDR1 ist die Regulation der Zelladhäsion an Kollagene, durch deren Bindung es auch aktiviert wird (Eswaramoorthy et al., 2010). Die durch den DDR1-Rezeptor aktivierten Ras/Raf/ERK- und PI3K/AKT-Signalwege fördern das Zellüberleben (Kim et al., 2011). Die Aktivität von DDR1 wird über die Expression einer großen Anzahl verschiedener Isoformen und über das Schneiden der Ektodomäne reguliert (Vogel, 2002). *DDR1* zeigte in der B-ALL eine durchschnittlich um das 29-fache erhöhte Transkription und wurde sehr stark exprimiert ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 10^{-2} - 10^0$ ). Die Analyse der Promotormethylierung legt nahe, dass die verstärkte Expression in adulter ALL zumindest teilweise durch eine verringerte Methylierung des untersuchten Promotorabschnitts um ca. 30 % zustande kommt (siehe auch Kapitel 4.5). Da DDR1 Lymphomzellen über Kollagenbindung vor Apoptose schützt, der *knock-down* das Zellüberleben verringert (Cader et al., 2013) und eine DDR1-vermittelte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika festgestellt wurde (Valiathan et al., 2012), sollte die potentielle Beteiligung von dysregulierten DDR1 an der Pathogenese akuter Leukämien weiter untersucht werden. Die Beeinflussung der Zelladhäsion über Kollagenbindung könnte auch den Kontakt leukämischer Stammzellen zur Stammzellnische beeinflussen. Eine therapeutische Inhibition kann über Imatinib (Bantscheff et al., 2007), Nilotinib, Dasatinib (Rix et al., 2007) und Bafetinib (Rix et al., 2010) erfolgen. Der DDR1-Inhibitor DDR1-IN-1 bietet die Möglichkeit einer selektiven Inhibition und zeigte in Kombination mit anderen Inhibitoren eine potenzierte antiproliferative Aktivität (Kim et al., 2013).

**EPHB4** hat eine duale Funktion als Tumorsuppressor oder Onkogen in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Ephrin-B2 Liganden. EPHB4 fördert die Differenzierung bestimmter hämatopoetischer Vorläuferpopulationen, vor allem die megakaryotische und erythroide Differenzierung. *EPHB4* wird in CD34+ Stammzellen und in erythroiden Vorläuferzellen exprimiert, der Ligand *Ephrin-B2* in den Stromazellen des Knochenmarks (Wang et al., 2002).

Die Interaktion von EPHB4 mit den *Ephrin-B2* exprimierenden Stromazellen steigert die Adhäsion hämatopoetischer Zellen an diese und spielt daher eine Rolle bei der Migration und Kolonisierung von Stamm- und Vorläuferzellen in der KM-Mikroumgebung (Charmsaz, 2013). Die Analyse der *EPHB4*-Expression ergab in den untersuchten B-Linien ALLs eine durchschnittlich um das 4-fache verstärkte Expression. Eine gesteigerte Adhäsion an Stromazellen könnte zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika beitragen und somit die Wahrscheinlichkeit für eine Rezidiventwicklung erhöhen. Die EPHB4-Inhibition in adulter B-ALL könnte zu einer erfolgreichen Therapie beitragen und ist über Antikörper möglich, welche in prä-klinischen Untersuchungen solider Tumore gute Effekte mit geringer Toxizität zeigten (Krasnoperov et al., 2010).

**LTK** fördert die Aktivität der PI3K/AKT-, JAK/STAT- und Ras/MAPK-Signalwege und überträgt so wachstumsfördernde und anti-apoptotische Signale in hämatopoetischen Zellen (Roll and Reuther, 2012; Ueno et al., 1997; Yamada et al., 2008). Da LTK hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen und besonders stark in der B-ALL exprimiert wird, stellt LTK ein gutes Ziel dar um spezifisch Leukämiezellen anzugreifen. Bisher existieren noch keine selektiven Inhibitoren.

Der Insulin-Rezeptor **INSR** reguliert die Glukoseaufnahme, die alternative Isoform INSR-A unterstützt Proliferation und Apoptoseschutz (Sciacca et al., 2002). Die Expression der *INSR-A*-Isoform zusammen mit der autokrinen Expression seines Liganden IGF2 ist ein wichtiger Mechanismus in normaler und maligner Stammzell-Expansion und trägt zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei (Wahner Hendrickson et al., 2009). Der Insulin-Rezeptor zeigte in der B-Linien ALL eine durchschnittlich 10-fach erhöhte Expression. Diese verstärkte Expression stellt möglicherweise eine Anpassung an den gesteigerten Glukosemetabolismus im Rahmen der malignen Zellexpansion dar. Da eine spezifische Inhibition des INSR-A-Signalwegs ohne Beeinflussung des metabolischen Effekts von Insulin bisher nicht möglich ist, stellt die INSR-Inhibition keine therapeutische Option dar.

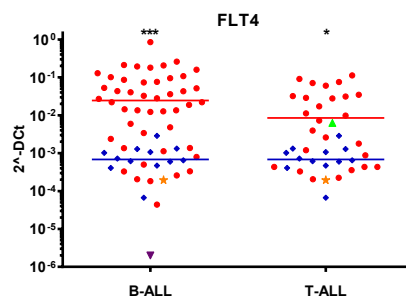
Die SRC-Kinase **YES1** wird ubiquitär exprimiert und ist in viele verschiedene Signalwege involviert (Oh et al., 2002). Die *YES1*-Expression war in T-ALL Proben um das 9-fache erhöht. B-ALL Proben wiesen sehr unterschiedliche Expressionslevel auf. Die erhöhte *YES1*-Expression in 36 % der untersuchten B-ALLs könnte nach Iacobucci et al. auf Inaktivierung des Transkriptionsfaktors Ikaros zurückgeführt werden (Iacobucci et al., 2012). Eine Beteiligung von YES1 an der Hämatopoese oder Leukämogenese wurde bisher noch nicht beschrieben. Eine Inhibition wäre beispielsweise über die Multikinase-Inhibitoren Dasatinib oder Saracatinib möglich.

Eine Hauptaufgabe von **ZAP70** liegt in der Signalweiterleitung des aktivierten T-Zell-Rezeptors. Über diese Funktion trägt ZAP70 zur T-Zell-Entwicklung und -Aktivierung sowie

zur Regulation der Proliferation und Zelldifferenzierung bei. ZAP70 ist zudem an Modifikationen des Zytoskeletts, der Adhäsion und Beweglichkeit von T-Lymphozyten beteiligt. Inaktivierende *ZAP70*-Mutationen führen zu schweren T-Zell-Immundefiziten. Sowohl gesunde T-Lymphozyten als auch leukämischen T-ALL-Zellen zeigten eine sehr starke *ZAP70*-Expression. Da *ZAP70* essentiell für die T-Zell-Entwicklung ist, Proliferation und Zelldifferenzierung reguliert, könnte ein Eingreifen in die *ZAP70*-Signalwege das leukämische Wachstum von T-ALL-Zellen inhibieren. Darüber hinaus spielt *ZAP70* auch eine Rolle bei der Entwicklung und Aktivierung von B-Zellen, bei der pro-B zu prä-B Transition und ist am B-Zellrezeptor-Signalweg beteiligt (Fischer et al., 2010; Amin et al., 2008). In B-lymphatischen CLL-Zellen korreliert die Höhe der *ZAP70*-Expression mit einer schnellen Progression der Krankheit und einem schlechteren Gesamtüberleben (Crespo et al., 2003; Wiestner et al., 2003). Auf den Zusammenhang zwischen Reifegrad der B-Linien ALL und der *ZAP70*-Expression wird unter Kapitel 4.4.5 näher eingegangen.

#### 4.4.1 Tyrosinkinasen mit hoher Expression in B- und T-Linien ALL

##### 4.4.1.1 Der VEGF-Rezeptor FLT4



Unter physiologischen Umständen wird *FLT4* (*VEGFR3*) von den Endothelzellen des lymphatischen Gewebes exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Lymphangiogenese und Angiogenese. Aktiviert wird *FLT4* über die Liganden VEGF-C und VEGF-D. Nach Bindung des Liganden VEGF-C ist *FLT4* in der Lage Homodimere oder Heterodimere mit KDR zu bilden und verschiedene Signalwege, nach Bindung von KDR die AKT-Signalkaskade und bei Bildung eines Homodimers den ERK1/2-Signalweg, zu aktivieren (Deng et al., 2015). Die durch VEGF-C aktivierte Signaltransduktion des *FLT4*-Rezeptors vermittelt leukämische Zellproliferation, Überleben und die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika (Dias et al., 2002). Eine Regulation der *FLT4*-Expression ist über NOTCH und Methylierung belegt (Benedito et al., 2012; Quentmeier et al., 2012). In ovariellen Tumorzelllinien induziert die Inhibition von *FLT4* einen Wachstumsarrest verbunden mit Reduktion der ERK-Phosphorylierung und verringerter Expression der Gene *E2F1*, *BRCA1* und *BRCA2*. Die Inhibition hebt zudem die Chemotherapie-Resistenz der untersuchten Zelllinien wieder auf (Lim et al., 2014). Eine erhöhte *FLT4*-Expression wurde in einem Teil der AML-Patienten

(Felder et al., 1997) sowie in vielen leukämischen Zelllinien nachgewiesen (Quentmeier et al., 2012). Die Expression in ALL oder anderen Leukämien wurde bisher nicht untersucht.

Von den in dieser Arbeit untersuchten ALL-Proben zeigte der Großteil eine sehr starke *FLT4*-Überexpression. In den B-Linien ALLs war eine durchschnittlich 32-fache, in den T-Linien ALLs eine 11-fache Expressionserhöhung festzustellen. Die Methylierungsanalyse des Promoters zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen ALL-Proben und Normalpersonen. Die Expressionserhöhung in T-ALL könnte über NOTCH zustandekommen, da der NOTCH-Signalweg in einem Großteil der T-ALL-Patienten konstitutiv aktiviert ist.

Aufgrund dieser sehr starken *FLT4*-Expression und dessen wachstumsfördernden Eigenschaften wurde *FLT4* genauer untersucht. Sequenzanalysen ergaben zwei verschiedene Polymorphismen, welche aber mit einer vergleichbaren Frequenz auch innerhalb der Normalpopulation vertreten waren.

Überexpressions-Analysen mittels des *pcDNA3.1*-Vektorsystems wurden in der B-lymphatischen ALL-Zelllinie Nalm 6 und der T-lymphatischen ALL-Zelllinie Molt 4 sowie in der murinen pro B-Zelllinie BaF3 durchgeführt. Diese Zellen wiesen in Expressionsanalysen eine nur geringe *FLT4*-Expression auf. Die BaF3-Zelllinie ist in ihrem Wachstum Interleukin 2 abhängig und eine Überwindung der Wachstumsinhibition in IL2-freiem Medium kann über die Expression eines wachstumsstimulierenden Gens zustande kommen. Die Überexpression von *FLT4* ermöglichte ein IL2-unabhängiges Wachstum der BaF3-Zellen und belegt somit eine proliferationsstimulierende Wirkung von *FLT4* in leukämischen Zellen. Ein *FLT4*-Überexpression in der T-Zelllinie Molt 4 bewirkte keine Veränderung des Wachstums, während die B-Zelllinie Nalm 6 ein stärkeres Wachstum assoziiert mit der transienten *FLT4*-Überexpression zeigte. Nalm 6-Zellen mit einer stabilen Überexpression zeigten keinen Unterschied im Wachstum. Da diese weiterhin ein unverändertes Ansprechen auf Sunitinib zeigten, besteht die Möglichkeit, dass das stabil überexprimierte *FLT4* inaktiviert vorlag. Um dies auszuschließen sollten in weiterführenden Experimenten konstitutiv aktivierte *FLT4*-Varianten verwendet werden.

Als *FLT4*-Inhibitoren wurden Sunitinib (Sutent®) und Sorafenib (Nexavar®) verwendet. Dies sind Multi-Kinase-Inhibitoren, welche für die Behandlung verschiedener Karzinomen zugelassen sind. In den *FLT4* abhängigen BaF3-*FLT4*-Zellen konnte eine spezifische Inhibition von *FLT4* ab einer Sorafenib-Konzentration  $< 1 \mu\text{M}$  gezeigt werden. Die Zellen wurden stark in ihrem Wachstum inhibiert, während *FLT4* negative BaF3-Zellen in IL2-haltigen Medium nur eine leichte Proliferationsreduktion aufwiesen.

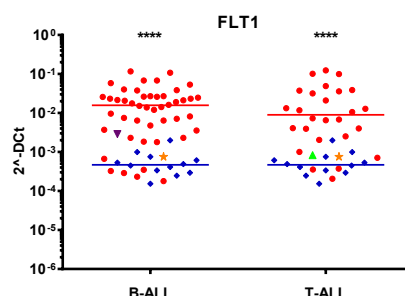
Die *FLT4*-Kinase wurde in Zusammenhang mit akut lymphatischen Leukämie des Erwachsenenalters bisher noch nicht untersucht. Die Ergebnisse der hier erfolgten Untersuchung legen nahe, dass diese eine wichtige Funktion bei der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung der ALL innehaben könnte. Dies wurde über die Ergebnisse der

Expressionsanalyse und dem positiven Effekt einer *FLT4*-Überexpression auf das Wachstum leukämischer Zelllinien belegt.

Die Inhibition des FLT4-Signalwegs stellt ein vielversprechendes Ziel bei der Behandlung akuter lymphatischer Leukämie dar. In Tumorzelllinien wurde eine FLT4-Inhibition mit Wachstumsarrest, reduzierter Proliferation und Überleben assoziiert (Lim et al., 2014; Varney and Singh, 2015). Da KDR in ALL-Patienten nicht exprimiert wurde, spielt der AKT-Signalweg bei der Vermittlung der proliferationsfördernden Eigenschaften von FLT4 mutmaßlich eine untergeordnete Rolle. Die Aktivierung der ERK1/2-Kaskade nach Bildung von Homodimeren kann Zellwachstum und Proliferation verstärken. Eine Verringerung der ERK-Kaskade trägt zur Proliferationsinhibition bei. Auch eine positive Beeinflussung der Genexpression von *BRCA1*, *BRCA2* und E2F1 sollte in weiteren Untersuchungen analysiert werden. BRCA-Proteine reparieren DNA-Schäden und eine Reduktion der DNA-Reparatur aufgrund einer verringerten *BRCA*-Expression kann zu einer Erhöhung der Chemotherapie-Sensitivität führen. Auch eine durch FLT4-Inhibition induzierte Reduktion des Transkriptionsfaktors E2F1, welcher an der Zellzyklus-Progression beteiligt ist, könnte zur Verringerung des Zellwachstums beitragen.

Die Multikinase-Inhibitoren Sunitinib und Sorafenib inhibieren FLT4, aber auch viele andere TK. Daneben kommen als FLT4-Inhibitoren auch der in der klinischen Prüfung Phase III befindliche Multi-Kinase-Inhibitor Linifanib und der potente, stark selektive FLT4-Inhibitor SAR131675 in Frage, welcher die Proliferation lymphatischer Zellen inhibiert (Alam et al., 2012). Aufgrund der spezifischeren Inhibition mittels dieser Substanzen und der Wirksamkeit schon geringerer Konzentrationen, könnten diese zur Behandlung von *FLT4*-Überexpressionen besser geeignet sein. Da FLT4 für die Erhaltung lymphatischer Gefäße essentiell ist, könnte eine therapeutische Inhibition jedoch starken Nebenwirkungen aufweisen.

#### 4.4.1.2 Der VEGF-Rezeptor FLT1

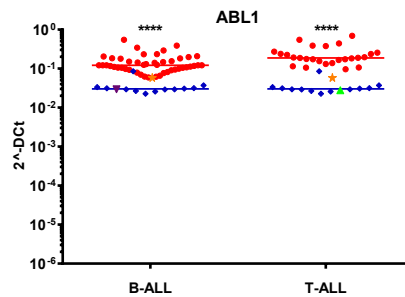


FLT1 ist ein Rezeptor für VEGF-A, VEGF-B und den *placental growth factor* (PlGF). FLT1 fördert die Zellteilung und ist ein wichtiger Regulator der Angiogenese (Shibuya, 2006). Eine Inhibition unterdrückt die Neovaskularisierung von Tumoren (Luttun et al., 2002). Die Signaltransduktion über FLT1 beeinflusst die Proliferation hämatopoetischer Zellen und die

Immunität von Monozyten/Makrophagen. FLT1 defiziente Knochenmark-Zellen zeigen eine unterdrückte Multilinen-Koloniebildung (Murakami et al., 2006) und eine Inhibition von FLT1 blockiert die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen (Hattori et al., 2002). Die Expression von *FLT1* in AML- und ALL-Zellen fördert Zellüberleben, Proliferation und Migration (Casalou et al., 2011). Des Weiteren moduliert FLT1 die Lokalisation von ALL-Zellen innerhalb des Knochenmarks, reguliert das Überleben akuter Leukämien und den Austritt leukämischer Zellen in die periphere Zirkulation. *In vivo* resultiert die Aktivierung von FLT1 in einer Migration der ALL-Zellen innerhalb des Knochenmarks von der Diaphyse zur Epiphyse. Diese Lokalisation scheint maßgeblich für das Überleben der ALL-Zellen zu sein, da eine FLT1-Inhibition mittels Antikörper *in vitro* kaum Auswirkungen auf das Zellüberleben hat, während *in vivo* vermehrt Apoptose induziert wird. Darüber hinaus verhinderte die Inhibition von FLT1 ein Austreten der Zellen aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation, verringerte eine Anreicherung dieser in den extramedullären Organen und erhöhte das Überleben ALL-transplantierte SCID-Mäuse (Fragoso et al., 2006).

*FLT1* ist in nahezu allen hier untersuchten ALL-Proben sehr stark überexprimiert; in der B-ALL durchschnittlich um das 21-fache und in der T-ALL um das 13-fache. Diese erhöhte Expression kann zu mindestens zum Teil auf eine verringerte Methylierung zurückgeführt werden, da die Methylierungsanalyse sowohl in B- als auch T-ALL eine um 40 % reduzierte Methylierung des untersuchten Promotorabschnitts ergab. Die aberrant hoch exprimierte Tyrosinkinase FLT1 ist ein sehr vielversprechendes therapeutisches Ziel, da es die Hämatopoese beeinflusst, Proliferation und Migration steigert sowie das Überleben von ALL-Zellen fördert. Auch eine verringerte Vaskularisierung des Knochenmarks mit einer damit einhergehenden verringerten Nährstoffzufuhr zu den leukämischen Zellen würde deren Wachstum begrenzen. Diese Eigenschaften legen nahe, dass eine Inhibition der FLT1-Aktivierung in adulter ALL über veränderte Lokalisation der leukämischen Blasten und verringerter Vaskularisierung von klinischen Nutzen sein könnte. Gegen eine FLT1-Inhibition spricht, dass die Rekrutierung von FLT1+ Stammzellen aus der KM-Mikroumgebung durch PIGF die Hämatopoese wiederherstellt und die Inhibition von FLT1 die hämatopoetische Erholung nach KM-Suppression blockieren würde (Hattori et al., 2002). Neben spezifischen FLT1-Antikörpern könnte die Inhibition über Vandetanib (Bianco et al., 2008), die Multi-Kinase-Inhibitoren Sorafenib, Sunitinib, Axitinib oder die in klinischen Studien befindlichen TKI Motesanib und BMS-690514 erfolgen.

#### 4.4.1.3 Die zytoplasmatische Tyrosinkinase ABL1



*ABL1* ist ein Proto-Onkogen, welches an zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Zellmigration, beteiligt ist und eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion über den T-Zellrezeptor spielt. *ABL1* pendelt zwischen Zytoplasma und Zellkern, nukleäres *ABL1* steigert die Transkription verschiedener Gene. *ABL1* wird als Antwort auf verschiedene Arten von Stress, wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies oder DNA-Beschädigungen, aktiviert und fördert oder inhibiert in Abhängigkeit vom p53-Status das Zellwachstum. Es kann die p53-MDM2 Regulationsschleife differentiell unterbrechen und so Zellwachstum und Überleben in Abhängigkeit vom zellulären Kontext regulieren (Greuber et al., 2013).

Die „Philadelphia-Translokation“ t(9;22) führt zur Entstehung des onkogenen Fusionsgens *BCR-ABL*. Das *BCR-ABL*-Fusionsgen enthält nahezu das vollständige *ABL1*-Gen, ist aber aufgrund der fehlenden autoinhibitorischen Myristylierungsstelle konstitutiv aktiviert (Nagar et al., 2003). *BCR-ABL* kann bei 90 % der CML-Patienten und bei 20 - 30 % der adulten ALL-Patienten (Wetzler et al., 1999) nachgewiesen werden. Auch andere *ABL1*-Translokationen, wie NUP214-*ABL1* in ca. 5 % der T-ALLs oder ETV6-*ABL1*, welches in verschiedenen Leukämie-Subtypen auftritt, können zur Leukämieentstehung beitragen (Graux et al., 2004). Die Inhibition des *BCR-ABL*-Fusionsproteins in CML ist das erfolgreichste Beispiel einer zielgerichteten Therapie unter Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren und stellt eine effektive Primär-Therapie für den Großteil der CML-Patienten dar (Wong and Witte, 2004). ALL-Patienten mit *BCR-ABL*-Translokation zeigten im Vergleich zu *BCR-ABL*-negativen Patienten unter klassischer Chemotherapie eine wesentlich geringere Remissionsdauer und ein schlechteres Gesamtüberleben. Eine Kombination der klassischen Chemotherapeutika mit Kinase-Inhibitoren wie Imatinib oder Dasatinib zeigte eine substantielle verbesserte Wirkung mit kompletten Remission bei einem Großteil der Patienten. Mittels Imatinib-Behandlung konnte das Gesamtüberleben nach 3 Jahren von 15 % auf 54 % erhöht werden, so dass der Einsatz von TK-Inhibitoren mittlerweile auch in der *BCR-ABL*-positiven ALL Standard ist (Thomas et al., 2010).

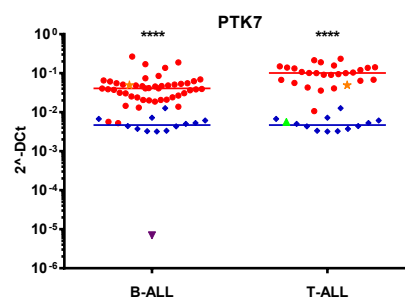
Ein Problem bei der Behandlung *BCR-ABL*-positiver Leukämien stellt die Entwicklung von Resistenzen dar. Diese kommen u.a. auch durch Imatinib-induzierte Veränderungen der



Stromazellen des Knochenmarks zustanden, welche dann vermehrt Botenstoffen, Adhäsionsmoleküle und weitere für das Zellüberleben essentielle Faktoren exprimieren. Diese ermöglichen vom onkogenen BCR-ABL-Signalweg auf andere Signalwege überzugehen und so der Chemotherapie zu entgehen (Mallampati et al., 2015). Neben Imatinib (Glivec; Novartis) werden auch TKI Nilotinib (Tasigna; Novartis), Dasatinib (Sprycel; Bristol-Myers Squibb) und Ponatinib (Iclusig; Ariad Pharmaceuticals) erfolgreich eingesetzt (Lee et al., 2011). Dabei hat Dasatinib die breiteste Wirkung gegen eine Vielzahl verschiedener Kinasen und auch gegenüber resistenten ABL1-Varianten, während Nilotinib und Imatinib eine wesentlich spezifischere Inhibierung ermöglichen (Hantschel et al., 2008).

Die hier untersuchten ALL-Patienten wiesen zwar keine BCR-ABL- oder NUP214-ABL1-Translokation auf, zeigten aber dennoch eine durchschnittlich um das 4 - 6-fach erhöhte *ABL1*-Expression. Da die onkogene Wirkung von verstärkt aktivem ABL1 vielfach belegt wurde, könnte eine ABL1-Inhibition auch in ALL-Patienten ohne ABL1-Translokation eine therapeutische Option darstellen.

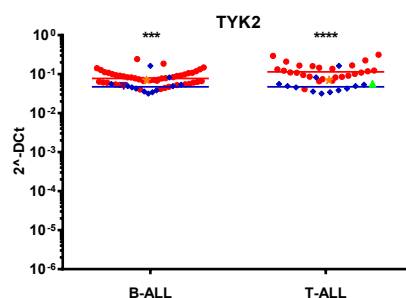
#### 4.4.1.4 Die Rezeptor-Tyrosinkinase PTK7



Die Protein-Tyrosinkinase 7 (PTK7), auch *colon carcinoma kinase 4* (CCK4) genannt, besteht neben der extrazellulären, Juxtamembran- und Transmembran-Domäne aus einer inaktiven Tyrosinkinase-Domäne (Jung et al., 2002). Liganden konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Durch alternatives Spleißen können fünf verschiedene Isoformen generiert werden, zusätzlich kann über zweifachen Schneiden von PTK7 ein C-terminales Fragment, welches zum Zellkern transloziert, sowie ein extrazelluläres N-terminales Fragment freigesetzt werden (Golubkov and Strongin, 2012). PTK7 ist ein Co-Rezeptor, welcher als molekularer Schalter im Wnt, Semaphorin/Plexin und VEGF-Signaltransduktionswegen fungiert (Peradziryi et al., 2012). In gesunden Personen wird *PTK7* von CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert, im Verlauf der weiteren Differenzierung ist eine *PTK7*-Expression dann nicht mehr feststellbar. In einem Großteil der AML-Patienten ist die *PTK7*-Expression hochreguliert und mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Anthrazyklinen assoziiert. PTK7 fördert in AML die Zellmigration leukämischer Zellen und steigert deren Apoptoseresistenz (Prebet et al., 2010). In kolorektalen Tumorzellen bewirkt ein *knock-down* von PTK7 eine Inhibition der Proliferation und eine Apoptoseinduktion (Meng et al., 2010).

Die Expression der hier untersuchten ALL-Proben zeigte sowohl in der T-Linien ALL als auch in der B-ALL eine sehr hohe Expression mit einem  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert von etwa  $4 \cdot 10^{-2}$  bei B-ALL und  $1 \cdot 10^{-1}$  bei T-ALL. In der B-ALL war die Expression damit im Mittel um das 7-fache und in der T-ALL um das 21-fache erhöht. Diese Ergebnisse wurden in T-ALL über FACS-Analysen auch auf Proteinebene belegt (Jiang et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen hoher *PTK7*-Expression und erhöhten Anthrazyklin-Resistenzen sollte auch in adulter ALL untersucht werden. Da *PTK7* nur eine Pseudo-TK-Domäne besitzt, sind typische TK-Inhibitoren unwirksam. Eine *PTK7*-Inhibition wären aber beispielsweise über Antikörper möglich, welche die Dimerisierung mit anderen Rezeptoren oder das Schneiden der Ektodomäne verhindern.

#### 4.4.1.5 Die zytoplasmatische Tyrosinkinase TYK2

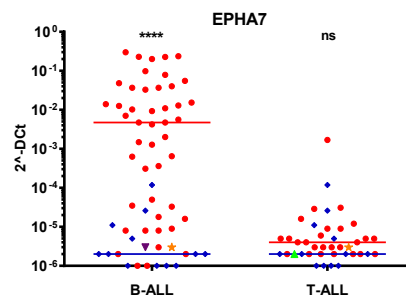


Die zytoplasmatische Tyrosinkinase 2 (TYK2) gehört zur Familie der Janus-Kinasen und ist an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben beteiligt. TYK2 spielt weiterhin eine unerlässliche Rolle bei der Weiterleitung multipler Zytokinsignale der angeborenen und erworbenen Immunität (Minegishi et al., 2006). Die Interferone IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$  und Interleukin (IL)-12 vermitteln über TYK2 die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs. T-ALL-Zellen und -Zelllinien zeigen eine Abhängigkeit vom diesem Signalweg, welcher in T-ALL das Zellüberleben über eine Hochregulation des anti-apoptotischen Proteins BCL2 vermittelt (Sanda et al., 2013).

Sowohl in B-ALL als auch T-ALL war eine sehr starke Expression des *TYK2*-Gens feststellbar, welche im Vergleich zu den Kontrollen etwa verdoppelt war. Laut PCR-Analyse stellt das katalytisch aktive Volllänge-Transkript die dominierende Variante da. Die katalytisch inaktive Spleißvariante *Tyk2-E971fsX67*-Isoform mit dominant negativen Effekt, welche in verschiedenen malignen Erkrankungen detektiert wurde (Ruhe et al., 2007), wurde nur in sehr geringem Umfang exprimiert. Die anti-apoptotische Wirkung des aktivierten TYK2-STAT1-BCL2-Signalwegs in T-ALL-Zellen trägt zur Aufrechterhaltung der Leukämie bei, ob dies auch in B-ALL der Fall ist, müssten weitere Untersuchungen klären. Eine Inhibition scheint vielversprechend und die Wirkung der *TYK2*-Überexpression in ALL sollte weiter untersucht werden. *TYK2*-Inhibitoren, welche selektiv nur *TYK2* und keine anderen Janus-Kinasen inhibieren, befinden sich in Entwicklung (Sohn et al., 2013; Liang et al., 2013).

## 4.4.2 Tyrosinkinasen mit hoher Expression in B-Linien ALL

### 4.4.2.1 Der Ephrin-Rezeptor EPHA7



*EPHA7* wird in zwei Spleißvarianten exprimiert: dem Volllängerezeptor *EPHA7-FL* und die verkürzte, lösliche *EPHA7-S*-Isoform, welche nur aus dem extrazellulären Anteil besteht. *EPHA7-S* agiert als dominant negativer Inhibitor des Volllängerezeptors, welcher dessen Aktivierung über die Bindung der Ephrin-Liganden vollständig unterbrechen kann. *EPHA7-S* fungiert ebenfalls als dominanter Inhibitor der *EPHA2*- und *A3*-Rezeptoren, blockiert deren Phosphorylierung und somit die Aktivierung der onkogenen ERK- und SRC-Signalwege (Dawson et al., 2007; Sawamiphak et al., 2010). *EPHA7-S* wird von normalen Lymphozyten exprimiert, in T-Zell lymphoblastischen Leukämien und Lymphomen sowie in follikulären B-Zell Lymphomen stellt *EPHA7-S* ein Tumorsuppressor dar (Oricchio et al., 2011). Im murinen Modell fördert der *knock-down* von *EPHA7* die Entwicklung von Lymphomen (Oricchio and Wendel, 2012). Eine Promotor-Hypermethylierung von *EPHA7* und eine damit einhergehende verringerte Expression konnte in verschiedenen onkologischen Erkrankungen festgestellt werden (Dawson et al., 2007; Guan et al., 2009; Wang et al., 2005). In T-lymphatischen Leukämien konnte eine Inaktivierung des *EPHA7*-Gens in 90 % der untersuchten Proben festgestellt werden (López-Nieva et al., 2012). Aufgrund dieser Ergebnisse wird *EPHA7* als Tumorsuppressor diskutiert. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von *Nakanishi et al.*, welche eine erhöhte Expression von *EPHA7* assoziiert mit verschiedenen *MLL*-Fusionen in akuten Leukämien feststellten. Der transkriptionelle Coaktivator *MLL*, welcher eine essentielle Rolle in der Expressionsregulation während der Hämatopoese spielt, konnte am *EPHA7*-Promotor lokalisiert werden und scheint die *EPHA7*-Expression zu regulieren. Eine verstärkte Expression von *EPHA7* wird von ERK-Phosphorylierung begleitet (Nakanishi et al., 2007).

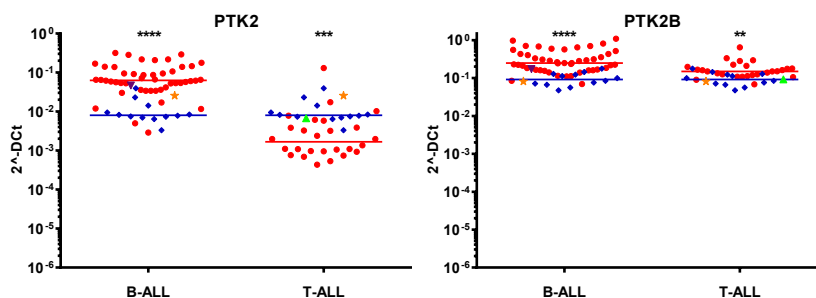
Die in dieser Arbeit verwendeten qPCR-Primer deckten sowohl den Volllängerezeptor, als auch die lösliche *EPHA7-S* Variante ab. Im Knochenmark von Normalpersonen und in nahezu allen T-ALL-Proben konnte keine Expression von *EPHA7* nachgewiesen werden. Der größte Teil der B-ALLs hingegen zeigte eine sehr starke Expression. Die Unterscheidung der vorliegenden Isoformen mittels PCR ergab, dass in B-ALL-Patienten vorwiegend die Volllänge-Variante gebildet wurde und die katalytisch inaktive Isoform nur in geringen Mengen vorlag.

Die hier durchgeführte Methylierungsanalyse ergab übereinstimmend mit den Ergebnissen von López-Nieva *et al.* eine Hypermethylierung des *EPHA7*-Promotors in der T-ALL. In den meisten B-ALL-Proben und in den Kontrollen lag das *EPHA7*-Gen unmethyliert vor.

Patienten mit *MLL*-Translokationen zählen zur Hochrisikogruppe der ALL und könnte die onkogene Wirkung von *MLL*-Translokationen über Inhibition von *EPHA7* reduziert werden, wäre dies bei der Therapie von *MLL*-Hochrisikopatienten von großem Nutzen.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektions- und Wachstumsexperimenten wurde die Expression von *EPHA7-S* und *EPHA7-FL* auf das Wachstum der B-ALL Zelllinie Nalm 6 und der T-Zelllinie Jurkat, welche in qPCR-Analysen keine Expression von *EPHA7* aufwiesen, untersucht. Diese zeigten keine veränderte Proliferation, weder nach Transfektion mit dem auf B-ALL-Zellen potentiell wachstumsfördernden *EPHA7-FL*, noch mit der in T-ALL wahrscheinlich tumorsuppressiv wirkenden *EPHA7-S* Isoform. In weiteren Analysen wäre die Verwendung von aktivierenden Liganden oder einer konstitutiv aktiven *EPHA7*-Variante sinnvoll, um eine Inaktivierung der Tyrosinkinase ausschließen zu können. Als Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden Linifanib und Dasatinib eingesetzt, wobei deren Wirkung nur gegenüber der EPH-Familie belegt ist, nicht spezifisch gegenüber *EPHA7*. Selektive *EPHA7*-Inhibitoren sind bisher nicht bekannt. Auch wenn hier keine Apoptoseinduktion durch *EPHA7-S* und auch keine Proliferationserhöhung durch *EPHA7-FL* gezeigt werden konnte, sollte diese RTK aufgrund der aberrant starken Expression in B-ALL in weiteren Untersuchungen analysiert werden, insbesondere da über Funktion und Wirkung von *EPHA7* bisher nur wenig bekannt ist.

#### 4.4.2.2 Die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen PTK2 und PTK2B



Die Protein-Tyrosinkinase 2 (*PTK2*), auch *focal adhesion kinase* (*FAK*) genannt, bildet zusammen mit *PTK2B* (alternativ: *Pyk2*, *FAK2*) eine eigenständige Familie zytoplasmatischer Tyrosinkinasen. *PTK2* und *PTK2B* spielen eine Schlüsselrolle bei Regulation der B-Zell-Morphologie. B-Zellrezeptor- und Integrin-Signaltransduktion induzieren die Phosphorylierung von *PTK2* und *PTK2B* (Tse *et al.*, 2009).

*PTK2* reguliert die Dynamik der fokalen Adhäsionskomplexe und Loslösung oder Festigung von Zell-Zell Kontakten abhängig vom zellulären Kontext. Fokale Adhäsionskomplexe sind

Verbindungen von Zellen mit der extrazellulären Matrix, welche aus bis zu 50 verschiedenen Proteinen bestehen können. Informationen der extrazellulären Matrix werden über diese Multi-Protein-Gerüste an die intrazellulären Signaltransduktionswege übermittelt. PTK2 ist als Kinase und molekulares Gerüst durch eine funktionelle Dualität gekennzeichnet. Als Gerüstprotein ermöglicht es die Bindung von Proteinen mit SH2-Domänen, wie beispielsweise die SRC-Kinasen, und aktiviert MAPK-, PI3K- und Phospholipase C $\gamma$ -Signaltransduktionswege. PTK2 beeinflusst darüber hinaus die Mikrotubuli-Stabilität, kontrolliert Gentranskription, Zellüberleben, Proliferation und Zellwachstum. Nukleäres PTK2 vermittelt eine transkriptionelle Inhibition des pro-apoptotischen Proteins p53. Über Assoziation mit Dynein ist PTK2 an den Zentrosomen colokalisiert und an der Mitose beteiligt (Lipinski and Loftus, 2010). Eine gesteigerte *PTK2*-Expression ist für eine Vielzahl metastatischer Karzinome beschrieben und die Überexpression korreliert mit Invasivität und Metastasierung (Li and Hua, 2008). In AML wurde bei ca. 50 % der Patienten eine *PTK2*-Überexpression festgestellt, welche mit einer schlechten Prognose und gesteigerten Resistenzen korreliert (Despeaux et al., 2011). In BCR-ABL-positiven Zellen ist PTK2 konstitutiv aktiviert und das Ausschalten von PTK2 inhibiert über eine reduzierte Zellproliferation und gesteigerte Apoptose die Leukämogenese. Diese Wirkung kommt durch eine reduzierte STAT5-Phosphorylierung und Kaspase 3-Aktivierung zustande (Le et al., 2009). In BCR-ABL-positiver ALL konnte *in vitro* und *in vivo* ein potenziertes Ansprechen auf TKI bei gleichzeitiger PTK2-Inhibition festgestellt werden. Der PTK2-Inhibitor inhibiert neben anderen Signaltransduktionswegen auch die PTK2-vermittelte leukämische Zelladhäsion zur Stammzellnische, welche mit einem schlechten Outcome assoziiert ist (Churchman et al., 2016). Auch in AML-transplantierten Mäusen zeigte der PTK2-Inhibitor VS-4718 *in vitro* und *in vivo* anti-leukämische Effekte und bewirkte ein verringertes Tumorwachstum und erhöhte Lebensdauer (Tam et al., 2014).

Während *PTK2* ubiquitär exprimiert wird, erfolgt die Expression von *PTK2B* zellspezifisch ausschließlich in neuronalen und hämatopoetischen Zellen. Die Aktivierung von PTK2B führt zu einer Modulation von Ionenkanälen, der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs, einer Inhibition der ERK-Aktivierung und zu einer verstärkten Zelladhäsion und Migration (Lipinski and Loftus, 2010). Die *PTK2B*-Expression ist mit einer Reduktion des p53-Levels und der Überwindung der G1-Blockade assoziiert (Lim et al., 2010). Eine erhöhte *PTK2B*-Expression wurde in verschiedenen Malignomen beobachtet und ist dort verbunden mit gesteigerter Metastasierung. PTK2B scheint ein Schlüsselregulator der Therapie induzierten Adhäsion und Migration zu sein und wird auf eine Imatinib-Behandlung hin verstärkt exprimiert. Die Inhibition von PTK2B verringert sowohl Zelladhäsion als auch Migration der CML-Zelllinie K562 (Ovcharenko et al., 2013). Durch Inhibition von FLT3 in FLT3-ITD Leukämiezellen wird u.a.

auch die Dephosphorylierung von PTK2B induziert. Dies könnte zur Freisetzung leukämischer Zellen aus der Knochenmark-Mikroumgebung beitragen (Katsumi et al., 2011). In T-lymphatischer ALL wurden Punktmutationen im *PTK2B*-Gen nachgewiesen (Kalender Atak et al., 2013), eine spezifische PTK2B-Inhibition durch PF-719 zeigte Wirkung auf Migration, Adhäsion und AKT-Aktivierung in follikulären und marginalen B-Zellen (Tse et al., 2012).

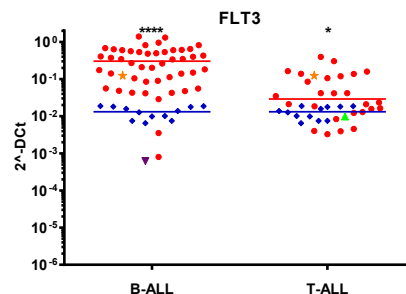
In den untersuchten B-Linien ALLs wurde *PTK2* sehr stark exprimiert und zeigte eine durchschnittlich 7-fache Expressionserhöhung, während in der T-ALL eine um das 5-fache verringerte Expression beobachtet wurde. Eine hohe *PTK2*-Expression war auch in gesunden, ausgereiften B-Zellen festzustellen. Dies ist nach Ozkal et al. auf die Beteiligung an dem B-Zellrezeptor-vermittelten B-Zell-Spreading zurückzuführen (Ozkal et al., 2009). Die Regulation der *PTK2*-Expression erfolgt über verschiedene Transkriptionsfaktoren wie p53, NFκB und Myc, welche in Leukämien oftmals eine Dysregulation aufweisen. Eine gesteigerte Expression wirkt über die aktivierten MAPK-, PI3K- und Phospholipase C $\gamma$ -Signaltransduktionswege in B-ALL vermutlich proliferationsfördernd und die Inhibition des proapoptotischen Proteins p53 könnte die Apoptoserate verringern. Analog zu den Erkenntnissen in BCR-ABL-positiven Leukämien könnte eine Inhibition von PTK2 in B-ALL über Verringerung der STAT5-Phosphorylierung zu einer reduzierten Zellproliferation und über Aktivierung der Kaspase 3 zu einer gesteigerten Apoptose beitragen. Auch die für BCR-ABL-positive ALL und AML beschriebenen gesteigerten Resistenzen über leukämische Zelladhäsion an die Stammzellnische und die vielversprechenden Ergebnisse der PTK2-Inhibition in AML und ALL-transplantierten Mäusen legen eine wirkungsvolle Therapie über PTK2-Inhibition nahe.

Die *PTK2B*-Expression ist in beiden ALL-Linien sehr hoch, in der B-ALL durchschnittlich um das 3-fache erhöht und in der T-ALL verdoppelt. PTK2B könnte über Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs und einer Reduktion des p53-Levels am Zellüberleben beteiligt sein und die Proliferation unterstützen. Die in CML festgestellte therapieinduzierte Adhäsion von CML-Zellen durch eine erhöhte *PTK2B*-Expression ist wahrscheinlich an der Entstehung von Rezidiven und der Leukämieerhaltung beteiligt. Folglich könnte durch eine PTK2B-Inhibition die Freisetzung leukämischer Zellen aus der Knochenmark-Mikroumgebung beeinflusst und somit möglicherweise auch die Rezidivrate verringert und die Chemotherapeutika-Sensitivität erhöht werden. Die PTK2B-Inhibition könnte ein wirkungsvolles Mittel bei der Behandlung akuter lymphatischer Leukämie darstellen und insbesondere auch der Resistenzentwicklung bei Imatinib-Behandlung BCR-ABL-positiver ALL vorbeugen.

Da die Inaktivierung von PTK2 von einer kompensatorischen Steigerung der *PTK2B*-Expression begleitet sein kann (Weis et al., 2008), könnte die alleinige Inhibition eine geringere Effektivität zeigen als eine duale. Besonders in B-ALL-Patienten, welche eine starke

Expression beider aufweisen, stellt die duale Inhibition wahrscheinlich die bessere Option dar. Verschiedene Inhibitoren von PTK2, PTK2B oder beider fokalen Adhäsionskinasen wurden bereits entwickelt. TAE226 (Novartis Pharma AG, Schweiz) inhibiert PTK2 und PTK2B ähnlich stark, PF-562271 und PF-431396 (Pfizer Inc., NY, NY) inhibiert PTK2 ca. 10-mal effektiver als PTK2B. VS-4718 und Defactinib (VS-6063) (Verastem Inc., Needham, MA) sind ebenfalls PTK2/PTK2B-Inhibitoren, welche in klinischen Studien der Phase 1 und 2 bei verschiedenen malignen Erkrankungen erprobt werden. Die Toxizität erscheint akzeptabel und könnten eine Kombination mit anderen Chemotherapeutika ermöglichen (Schultze and Fiedler, 2010). Der Inhibitor PF-573228 (Pfizer Inc., NY, NY) wirkt selektiv auf PTK2; PF-4618433 und PF-719 auf PTK2B.

#### 4.4.2.3 Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3



FLT3 spielt eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. *FLT3* wird vom Stammzellstadium bis zu den frühen lymphatischen, myeloischen und Granulozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen exprimiert (Kikushige et al., 2008). Der durch Bindung des FLT3-Liganden FL aktivierte Rezeptor aktiviert verschiedene Signalkaskaden, welche die Transkription von in Proliferation und Differenzierung involvierten Genen erhöhen (Gilliland and Griffin, 2002; Schmidt-Arras et al., 2004). Über interne Tandemduplikationen (ITD) konstitutiv aktiviertes FLT3 vermittelt die Aktivierung des STAT5-Pfads, welcher anti-apoptotische und proliferationsfördernde Signale vermittelt. Die ITD des *FLT3*-Gens ist mit einer Frequenz von ca. einem Drittel eine der häufigsten Genmutationen in der AML und mit einer schlechten Prognose assoziiert. Auch in seltenen Fällen der B-Linien ALL sind FLT3-ITD zu beobachten (Andersson et al., 2008). Des Weiteren zeigt die Wildtyp-Form von FLT3 ebenfalls oft eine stark erhöhte Expression in AML-Patienten. In ALL-Zellen mit MLL-Rearrangement wird die FLT3-Kinase verstärkt exprimiert und ist konstitutiv aktiviert. Über eine Inhibition von FLT3 werden diese Zellen *in vitro* und *in vivo* abgetötet und die FLT3-Inhibition zeigt einen synergistischen Effekt mit anderen Chemotherapeutika (Brown et al., 2005, 2006). Eine Vielzahl verschiedener FLT3-Inhibitoren sind bereits zugelassener oder befinden sich in klinischer Prüfung.

In klinischen Studien wurde der Einsatz der FLT3-Inhibitoren Sunitinib, Sorafenib, Midostaurin, Lestaurtinib, Tandutinib und Quizartinib bei AML-Patienten mit FLT3-ITD oder einer hohen Expression von FLT3-WT getestet. Durch den Einsatz von FLT3-Inhibitoren als

Monotherapeutikum konnte das Gesamtüberleben und die Remissionsraten der AML-Patienten, trotz guter Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen (Verringerung der FLT3-Phosphorylierungen und der FLT3 aktivierten Signalwege), meist nur wenig beeinflusst werden. Dabei unterschied sich der Behandlungserfolg der FLT3-Inhibition zwischen Patienten mit FLT3-Wildtyp und konstitutiv aktivierten FLT3 sehr stark. AML-Zellen mit mutierten FLT3 sind wesentlich stärker von dessen Aktivität abhängig und die Inaktivierung hatte dementsprechend größere Auswirkungen. Die Inhibition von überexprimierten FLT3 zeigte in deutlich weniger Patienten einen Effekt. Nach bisherigem Kenntnisstand scheinen FLT3-Inhibitoren zumindestens als Monotherapeutikum ungeeignet zu sein, der Einsatz von Sunitinib (Fiedler et al., 2005), Sorafenib (Pratz et al., 2010) und Tandutinib (DeAngelo et al., 2006) bewirkten nur eine partielle Remission von kurzer Dauer. Allein das spezifischer wirkende Quizartinib erreichte als Monotherapeutikum in immerhin etwa 50 % der Patienten mit *FLT3*-ITD Mutationen und 25 % der *FLT3*-WT Patienten eine komplette Remission (Wander et al., 2014). Mittels Lestaurtinib konnte eine leichte Erhöhung der kompletten Remission in AML erreicht werden, das Gesamtüberleben blieb aber unverändert (Levis et al., 2011). In Kombination mit Standardchemotherapie zeigten hingegen verschiedene Studien eine Verbesserung des Therapieerfolges. Midostaurin in Kombination mit Standard-Chemotherapeutika erreichte einen hohen Anteil kompletter Remissionen mit vielversprechende Überlebensdaten. Sowohl in FLT3-ITD als auch FLT3-WT Patienten konnte das mediane Überleben von 25 auf 75 Monate erhöht werden (Stone et al., 2012) und die aktuell noch andauernde Studie zeigt eine Verbesserung des ereignisfreien Überlebens [27]. Auch die Kombination mit Sorafenib erhöhte unabhängig vom Vorliegen einer FLT3-ITD das ereignisfreien 3-Jahres Überleben von 22 % auf 40 % (Röllig et al., 2015) und eine Sorafenib-Behandlung von FLT3-ITD Patienten nach Transplantation war mit einem verringerten Rezidiv-Risiko assoziiert (Brunner et al., 2016). Derzeit wird in der ALL0631 Studie der Einsatz von Lestaurtinib bei der Behandlung kindlicher ALL mit Translokationen im MLL-Gen, welche auch immer eine konstant hohe FLT3-Expression aufweisen, getestet [25].

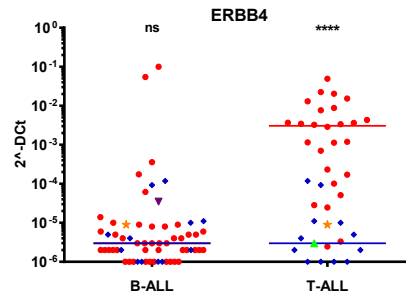
Nahezu alle untersuchten B-Linien ALL-Patienten zeigten eine sehr starke *FLT3*-Expression mit einer durchschnittlich 20-fachen Expressionserhöhung. Auch ein Teil der Patienten mit T-ALL zeigte eine hohe *FLT3*-Expression. Diese hohen Expressionen sprechen für eine wichtige Funktion bei der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung der akuten lymphatischen Leukämie, welche für AML bereits belegt ist. Auch bei ALL-Patienten mit Überexpression von FLT3 könnte eine Kombination von FLT3-Inhibitoren mit Standard-Chemotherapeutika den Behandlungserfolg erhöhen und durch einen verringerten Einsatz dieser die Toxizität der Therapie gesenkt werden. Dies würde insbesondere älteren Patienten zugutekommen.



Entsprechend den Ergebnissen der Inhibitionsstudien von FLT3-WT in AML würden FLT3-Inhibitoren als Monotherapeutikum wahrscheinlich keine Therapieoption darstellen.

#### 4.4.3 Tyrosinkinasen mit hoher Expression in T-Linien ALL

##### 4.4.3.1 Die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB4



Die Tyrosinkinase *ERBB4*, auch *Her4* genannt, gehört zur Familie der *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptoren. *ERBB4* wird durch sieben verschiedene Liganden, vor allem durch Neureguline und HB-EGF, aktiviert und bildet daraufhin sowohl Homo-, als auch Heterodimere mit anderen EGF-Rezeptoren, gefolgt von Autophosphorylierung und Kinaseaktivierung. Nach Ligandenbindung oder über Aktivierung durch PKC wird *ERBB4* durch Metalloproteasen geschnitten und die lösliche C-terminale, intrazelluläre Domäne (ICD) freigesetzt (Linggi and Carpenter, 2006). Dieses *ERBB4*-Fragment transloziert in den Nukleus und wirkt dort als transkriptioneller Coaktivator oder Corepressor. Es wurden Interaktionen von *ERBB4*-ICD u.a. mit dem TAB2/NCoR-Komplex, STAT5a, YAP, ETO2, MDM2, Kap1 und AP-2 nachgewiesen (Aqeilan et al., 2005; Arasada and Carpenter, 2005; Gilmore-Hebert et al., 2010; Jones, 2008; Linggi and Carpenter, 2006; Sardi et al., 2006; Sudol, 2014; Sundvall et al., 2010).

Für *ERBB4* wurden sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften beschrieben. *ERBB4* kann in vier verschiedenen Isoformen vorliegen, dabei unterscheiden diese sich in einer alternativ gespleißten Juxtamembran- (JmA und JmB) und der zytoplasmatischen (CYT1 und CYT2) Domäne. Die JmB-Isoform hat eine verkürzte JM-Domäne und kann aufgrund dessen nicht durch Metalloproteasen prozessiert werden. Der CYT2-Isoform fehlen 16 Aminosäuren innerhalb der C-terminalen Domäne, welche ein PPXY-Motiv beinhalten. Dementsprechend hat die *ERBB4*-CYT2-Isoform eine längere Halbwertszeit (Veikkolainen et al., 2011). Die *ERBB4* JmA- und JmB-Isoformen fördern antagonistische Zellantworten. So ist die JmA CYT2-Isoform, aber nicht JmB CYT2, zur Liganden-unabhängigen Aktivierung fähig und fördert das Zellüberleben, während JmB den gegenteiligen Effekt hat und die Apoptose unterstützt (Sundvall et al., 2010). Die CYT1- und CYT2-Isoformen scheinen ebenfalls antagonistische zelluläre Aktivitäten zu vermitteln. Das CYT1 spezifische PPXY Motiv ist für die Ubiquitinierung und Endozytose notwendig und steigert dessen Degradation (Sundvall et

al., 2008b). Im Mausmodell fördert die lösliche CYT1-ICD die Differenzierung und verringert das Wachstum, während CYT2-ICD die Proliferation steigert. In Mammakarzinom-Zellen inhibiert ERBB4-JmA CYT1 das Zellwachstum von Brustzellen *in vitro*, während JmA CYT2 dieses fördert (Muraoka-Cook et al., 2009).

Aktivierende ERBB4-Mutationen wurden in verschiedenen malignen Erkrankungen detektiert (Rudloff and Samuels, 2010; Prickett et al., 2009), in AML und ALL wurden keine gefunden (Lilljebjörn et al., 2012; Mullighan, 2011; Mullighan et al., 2007).

In dieser Arbeit zeigte *ERBB4* in der T-lymphatischen Leukämie eine sehr starke Expression, während in den Kontrollen dieses Gen ausgeschaltet vorlag. PCR-Analysen zur Unterscheidung der Isoformen ergaben, dass in adulten T-ALLs vorwiegend die CYT1-Isoform, nur einige Proben zeigten einen höheren Anteil an der proliferationsfördernde Variante CYT2, und ausschließlich die JmA-Variante transkribiert wurden. Die Expression der JmA-Variante ermöglicht eine Prozessierung von ERBB4 und kann Einfluss auf die Genexpression nehmen.

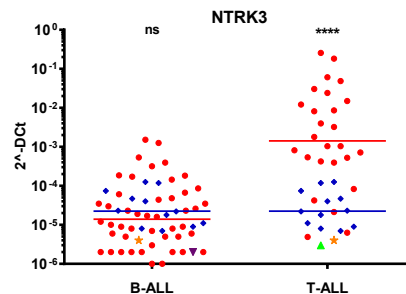
In Zellkulturversuchen wurde der Einfluss einer Transfektionen mit den *ERBB4*-Spleißvarianten *ERBB4-JmA-CYT1* und *ERBB4-JmB-CYT1* auf das Wachstum der T-Zelllinien Jurkat und Molt 4 untersucht. Die *ERBB4*-Überexpression zeigte nur geringe Effekte auf die Proliferation, obwohl die Spleißvarianten JmA und JmB sehr unterschiedlich agieren sollen. Es war über diese Versuche nicht möglich zu beurteilen, ob die JmA-CYT1-Isoform eine proliferationsfördernde oder inhibitorische Wirkung auf T-ALL-Zellen hat.

Als Inhibitor wurde Lapatinib (Tykerb®) eingesetzt. Dieser ist bei der Behandlung von ERBB2 (Her2) positiven Mammakarzinomen bereits zugelassen, zeigt jedoch eine um das 36-fache geringere inhibitorische Wirksamkeit gegenüber ERBB4 (Qiu et al., 2008). Da *ERBB2* in T-ALL ähnlich stark exprimiert wird wie *ERBB4*, entfaltet Lapatinib seine wachstumsinhibitorische Wirkung wahrscheinlich vorwiegend über die Inhibition von ERBB2 und zeigte auch erst ab der vergleichsweise sehr hohen Konzentration von 50 µM (Mamma-Karzinom Zelllinien werden bereits bei einer 5 µM Konzentration inhibiert) eine inhibitorische Wirkung.

Transfektion mit den intrazellulären Anteilen der CYT1- und CYT2-Isoformen könnten weitere Einblicke in die Wirkung von ERBB4 erlauben und in weiteren Analyse sollte der Einfluss geringer Mengen der JmA-CYT2-Isoform getestet werden. Auch wenn die Wachstumsanalyse ERBB4-transfizierter Zelllinien keinen Hinweis auf eine Proliferationssteigerung ergab, könnte ERBB4 aufgrund der Aktivierung der proliferationsfördernden PI3K/AKT- und Ras/MAPK-Signalkaskaden und des Einflusses der ICD auf die Expression verschiedener Gene dennoch eine Rolle bei der Entwicklung von T-ALL spielen. Ein vielversprechender ERBB4-Inhibitor

scheint Canertinib zu sein, welcher eine stärkere Bindung an ERBB4 aufweist (Trinks et al., 2011).

#### 4.4.3.2 Rezeptor-Tyrosinkinase NTRK3

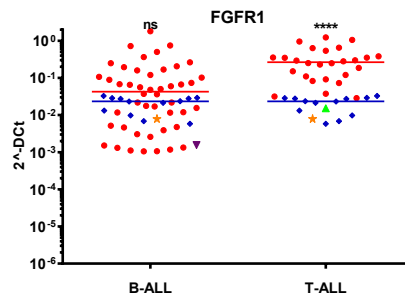


Die Rezeptor-Tyrosinkinase NTRK3, auch TrkC genannt, wird durch den Liganden Neutrophin 3 aktiviert und wirkt auf die AKT- und ERK-Signalwege. *NTRK3* wird physiologisch hauptsächlich im Gehirn exprimiert. Eine wichtige Funktion erfüllt es in Schwann-Zellen, in denen eine NTRK3-Aktivierung deren Myelinisierung inhibiert. Über alternatives Spleißen werden zwei verschiedene Isoformen gebildet: die katalytisch aktive Volllänge Isoform und eine verkürzte, inaktive Variante. In AML und kindlicher B-ALL wurde über einzelne Fälle berichtet, in denen eine *ETV6-NTRK3*-Fusion mit konstitutiv aktivierter Kinasedomäne vorliegt (Eguchi et al., 1999; Roberts et al., 2014). Dieses Fusionsprotein bewirkt über die Aktivierung von Ras-Erk1/2- und PI3-Kinase-AKT-Signalwege eine Transformation von Fibroblasten (Tognon et al., 2001) und soll die Signaltransduktion über den *transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ), welcher meist tumorsuppressiv wirkt, unterdrücken (Jin et al., 2005).

Die Expressionsanalyse ergab, dass *NTRK3* spezifisch in der T-Linien ALL stark erhöht war, durchschnittlich um das 63-fache und teilweise noch sehr viel höher, während gesunde Probanden dieses Gen kaum exprimierten. PCR-Analyse der cDNA dieser T-ALL Patienten ergab, dass hauptsächlich die ungespleißte, aktive Volllänge-Form gebildet wurde. In unserem Patientenkollektiv erbrachte die Analyse auf *ETV6-NTRK3*-Fusionen mittels Multiplex-PCR keinen Nachweis dieser Fusion. Über Eigenschaften, Aufgaben und Signalweg-Aktivierungen von NTRK3 in hämatopoetischen T-Zellen liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

Da NTRK3 physiologisch wichtige Aufgaben im zentralen Nervensystem innehat und bei neuronalen Tumoren eine hohe *NTRK3*-Expression mit einer besseren Prognose assoziiert ist, sollten NTRK3-Inhibitoren die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Eine Inhibition von NTRK3 ist mit Lestaurtinib möglich (Miknyoczki et al., 1999). Weitere Inhibitoren, beispielsweise AR523 (*Array Biopharma*) oder GNF5837, befinden sich in Entwicklung.

#### 4.4.3.3 Die Rezeptor-Tyrosinkinase FGFR1



FGFR1 gehört zur Familie der *fibroblast growth factor* Rezeptoren (FGFR), welche durch die Bindung verschiedener FGFs und HSPGs (*heparan sulfate proteoglycan*) aktiviert werden. FGF-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Migration und Differenzierung. Die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege erfolgt über Bildung von Multi-Proteinkomplexen, welche den PI3K-AKT-Signalweg und die Ras-MAPK-Kaskade aktivieren (Schlessinger, 2004). Eine erhöhte Expression wurde in verschiedenen Tumorentitäten festgestellt (Dutt et al., 2011; Tsimafeyeu et al., 2011). Verstärkt exprimiertes und aktiviertes FGFR1 induziert die für die Metastasierung essentielle Epithelial-mesenchymale Transition über Aktivierung von MAPK, ERK1/2, p38 und Phospholipase C $\gamma$  (Nguyen et al., 2013; Tomlinson et al., 2012).

Die seltenen *FGFR1*-Translokationen finden sich in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen, wie MPS, AML, T- oder B-lymphatischen Leukämien und Lymphomen (Lee et al., 2013). Bisher wurden Fusionen mit zwölf verschiedene Partnern identifiziert, welche alle eine konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität aufweisen und essentiell an der Pathogenese beteiligt sind (Trimaldi et al., 2013). Konstitutiv aktives FGFR1 resultiert in einer konstitutiven STAT5-Phosphorylierung (Heath and Cross, 2004) und ist assoziiert mit gesteigertem Zellüberleben über den MAPK- und AKT-Weg und einer verringerten Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine FOXO3a und BAD (Dong et al., 2007). Bei der Lymphomentstehung ist die pathogene SRC-Aktivierung durch die FGFR1-Kinase von entscheidender Bedeutung (Ren et al., 2011). Myeloische und lymphatische Neoplasien mit FGFR1- oder PDGFR-Abnormalitäten werden seit 2008 von der WHO als eigene Entität klassifiziert (Tefferi and Vardiman, 2008). Neoplasien mit *FGFR1*-Translokationen sind durch eine schnelle Transformation in akute Leukämien charakterisiert, lassen sich mit konventioneller Chemotherapie nur schlecht behandeln und das Überleben beträgt durchschnittlich nur zwölf Monate (Macdonald et al., 2002).

Die Expressionsanalyse in adulter ALL ergab eine um das 15-fache verstärkte *FGFR1*-Expression in der T-ALL, während B-ALL Patienten erhöhte und verringerte Expressionen zeigten. Eine *FGFR1*-Translokation konnte mittels Langstrecken-inverser PCR in keiner der Patienten mit sehr hoher *FGFR1*-Expression nachgewiesen werden. Da eine konstitutive

Aktivierung von FGFR1 zur Bildung aggressiver Leukämien mit schlechter Prognose führt und eine erhöhte *FGFR1*-Expression Zellwachstum und –überleben über MAPK- und STAT5-Signalwege steigert, könnte FGFR1 auch eine Rolle bei der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung der Leukämie in T-ALL- und einem Teil der B-ALL-Patienten spielen.

Der Multi-Kinase-Inhibitor Ponatinib, welcher sich in klinischen Studien der Phase 3 bei Behandlung BCR-ABL-positiver CML befindet, zeigte ebenfalls eine potente Inhibition von FGFR1-Fusionsproteinen (Ren et al., 2013). Weitere FGFR-Inhibitoren mit größerer Selektivität befinden sich in verschiedenen Phasen klinischer Studien: AZD4547 (AstraZeneca), BGJ398 (Novartis) (Guagnano et al., 2011) und LY2874455 (Eli Lilly) (Zhao et al., 2011).

#### 4.4.4 Tyrosinkinasen mit verringerter Expression in B- und T-Linien ALL

Die Tyrosinkinasen BMX, KDR, FGR und HCK zeigten eine sehr starke Verringerung der Expression in den untersuchten Leukämiezellen im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Die *hematopoietic cell kinase (HCK)* wird vor allem in hämatopoetischen Zellen, insbesondere in B-Vorläuferzellen, exprimiert und ist in die Regulation der frühen B-Zell-Differenzierung involviert (Taguchi et al., 2000). Die untersuchten ALL-Proben zeigten alle eine verringerte *HCK*-Expression. Diese verringerte Expression kommt nach den Ergebnissen der Methylierungsanalyse in der T-ALL über eine Hypermethylierung des *HCK*-Promotors zustande. In der B-ALL liegt der untersuchte Promotorabschnitt unmethyliert vor. Eine Verringerung der *HCK*-Expression kann in Abhängigkeit vom genauen zellulären Kontext die Apoptose reduzieren (in Stammzellen verringert die Inaktivierung von HCK die Apoptose und erythroide Differenzierung, während eine verstärkte Expression die Apoptose einleitet) oder steigern (in myeloischen AML und CML-Zellen bewirkt eine HCK-Inhibition eine Verstärkung der Apoptose) [24]. Die über alle Proben hinweg reduzierte Transkription lässt vermuten, dass in ALL-Zellen eine Ausschaltung dieses Gens wichtig für die Überwindung von Apoptosesignalen ist. Abschließend kann dies aber erst in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Für **BMX** wurden sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Eigenschaften beschrieben, es soll Differenzierung, Beweglichkeit und Apoptose beeinflussen und an der Aktivierung von STAT3, des MAPK- und NFκB-Wegs beteiligt sein (Cenni et al., 2012; Jiang et al., 2007; Tsai et al., 2000). Die Expression von BMX war in der B-ALL um das 333-fache und in der T-ALL um das 100-fache verringert. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dieser sehr starken Reduktion und Leukämieentstehung gibt es bisher nicht.

**KDR** (*VEGFR2*) wird von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und bei der weiteren Differenzierung herunterreguliert (Casella et al., 2003). Das *KDR*-Gen wurde in dem meisten ALL-Proben nicht oder nur gering exprimiert. Diese Verringerung der Expression gegenüber

gesunder Kontrollen kam nach den Ergebnissen der Methylierungsanalyse in vielen ALL-Proben über eine Hypermethylierung des Promotors zustande, während die Kontrollen unmethyliert vorlagen. Insbesondere die T-Zellen zeigten eine starke Hypermethylierung der untersuchten Promotorregion. Dies unterscheidet ALL von anderen Leukämien, in denen KDR häufig stark exprimiert und wichtig für das Zellüberleben ist (Padró et al., 2002).

**FGR** ist an Migration und Adhäsion über den Integrin-Signalweg beteiligt (Continolo et al., 2005). Die *FGR*-Expression war in den gesunden lymphatischen Zellen sehr hoch und in der B-ALL durchschnittlich um das 33-fache und in der T-ALL um das 5-fache verringert.

Inwieweit die verringerten Expressionen von HCK, *BMX*, *KDR* und *FGR* für die Entartung der Zellen von Bedeutung sein könnten, müssten weiterfolgende Analysen klären.

### 4.4.5 Tyrosinkinasen als prognostische Marker

Viele Tyrosinkinasen waren in verschiedenen ALL-Patienten sehr unterschiedliche stark exprimiert. Von diesen stellen die Kinasen EPHA3, EPHB3, KIT, ZAP70, LTK und PDGFRB die vielversprechendsten prognostischen Marker dar.

#### 4.4.5.1 EPHA3

In der B-ALL zeigte eine Gruppe von sieben Patienten eine sehr starke Expression der EPHA3-Kinase, während diese in Normalpersonen und den übrigen ALL-Proben kaum nachweisbar war. EPHA3 ist über die Bindung des Liganden Ephrin-A5 an der Zellkommunikation und in Jurkat-Zellen an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt (Smith et al., 2004). EPHA3 scheint das Wachstum und Überleben von NUP98-HOXA9 oder BCR-ABL-positiven Leukämie-Stammzellen in der Mikroumgebung des Knochenmarks zu beeinflussen. Ein EPHA3 *knock-down* in LSCs reduziert leukämisches Zell-Engraftment und ist daher wahrscheinlich am LSC-Wachstum und Überleben in der Knochenmark-Mikroumgebung beteiligt (Ashton et al., 2012). Die Inhibition von EPHA3 reduziert *in vitro* und *in vivo* das Wachstum EPHA3 exprimierender Leukämiezellen (Miller et al., 2013). Für verschiedenen lymphatische und myeloische Leukämien wurden Alterationen der Kopienanzahl (*copy number variations*, CNV) beschrieben (Guan et al., 2011). Hier konnte mittels qPCR der genomischen DNA keine CNVs nachgewiesen werden.

EPHA3 stellt ein potentiell therapeutisches Ziel für Patienten mit hoher *EPHA3*-Expression dar, insbesondere da dieser Rezeptor in gesunden lymphatischen Zellen nur gering exprimiert wird und eine Inhibition in prä-klinischen Tests therapeutischer Antikörper geringe Toxizität zeigt und fast nur auf die leukämischen Zellen wirkt [26]. Der monoklonale EPHA3-Antikörper KB004 von *KaloBios* befindet sich in klinischen Studien der Phase 2. In weiterfolgende Untersuchung sollte die *EPHA3*-Expression eines größeren Kollektivs mit dem Therapieansprechen und Langzeitüberleben abgeglichen werden. Trägt eine hohe *EPHA3*-

Expression zum Überleben der LSC in ALL bei, wären frühere Rezidive und ein schlechteres Gesamtüberleben zu erwarten. Dann könnte bei Patienten mit hoher *EPHA3*-Expression eine an das größere Risiko angepasste Therapie erfolgen und eine spezifische Inhibition wäre eine vielversprechende Option.

#### 4.4.5.2 EPHB3

Die unterschiedliche Expression von *EPHB3* in B-lymphatischer ALL könnte relevant sein, da ein Einfluss von *EPHB3* auf die Apoptoseinduktion und auf die *Graft-versus-leukemia* Reaktionen angenommen wird. Diese ist bei allogenen Stammzell-Transplantationen entscheidend für die Elimination maligner Zellen und zum Erhalt der Remission. *EPHB3* ist an Migration und Proliferation in der Stammzellnische beteiligt und unterdrückt über Aktivierung von AKT die Fas-induzierte Apoptose (Maddigan et al., 2011). Ein Vergleich der *EPHB3*-Expression mit dem Langzeit-Überleben und dem Ansprechen auf allogene Stammzell-Transplantationen könnte neue, für die Planung der Therapie wichtige Anhaltspunkte liefern.

#### 4.4.5.3 KIT

Der Stammzellrezeptor KIT ist wichtig für Überleben, Selbsterneuerung und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. KIT beeinflusst über verschiedene Signalwege, wie den JAK/STAT-, PI3K/AKT/mTOR oder den Ras/Raf/ERK/MAPK-Signalweg, die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Hämatopoese. In AML stellen Mutationen und *KIT*-ITDs die zweithäufigste Veränderung dar (Malaise et al., 2009). Auch leukämische Stammzellen der AML weisen häufig eine hohe Expression von *KIT* auf, welche das Selbsterhaltungspotential der LSCs unterstützt (Somerville and Cleary, 2006). Die meisten der hier untersuchten ALL-Proben zeigten eine nur geringe *KIT*-Expression. Nur vier T-ALL Proben zeigten eine den CD34+ Stammzellen vergleichbare *KIT*-Expression. Eine dezidierte Untersuchung dieses Patientenkollektivs hinsichtlich Überleben und Therapieansprechen wäre interessant.

#### 4.4.5.4 ZAP70

*ZAP70* wurde in der B-lymphatischen ALL sehr unterschiedlich exprimiert und zeigte eine Abhängigkeit vom Reifegrad. Unreifere Leukämietypen zeigten eine höhere *ZAP70*-Expression; eine besondere Prävalenz war in der prä B-ALL festzustellen. 69 % der prä B-ALL-Proben zeigten eine durchschnittlich um das 6-fache verstärkte Expression. Hingegen zeigten nur 48 % der common ALLs und 35 % der pro B-ALL-Proben eine erhöhte Expression. Diese Werte decken sich mit den Ergebnissen von *Chiaretti et al.* (Chiaretti et al., 2006). In der B-lymphatischen CLL stellt die *ZAP70*-Expression einen wichtigen prognostischen Marker dar, eine hohe *ZAP70*-Expression korreliert mit einem schnellen Fortschreiten der Krankheit und einem schlechteren Gesamtüberleben (Crespo et al., 2003; Wiestner et al., 2003). Dabei wirkt *ZAP70* in den B-lymphatischen CLL-Zellen über Aktivierung des B-Zellrezeptor-Signalwegs,

eine verlängerte Aktivierung verschiedener Schlüsselmediatoren (Gobessi et al., 2007) und über Erhöhung der Expression von NFκB-Zielgenen (Pede et al., 2013). ZAP70 steigert die Migration maligner B-Zellen in die unterstützende Mikroumgebung des Knochenmarks (Calpe et al., 2013) und in CLL-Zellen wurde eine Korrelation zwischen ZAP70-Expression und Stromazell-Adhäsion nachgewiesen, welche das Überleben steigert und Schutz vor Chemotherapeutika bietet (Lafarge et al., 2015). In ALL wurde eine hohe ZAP70-Expression mit einer höheren Rezidiv-Rate assoziiert (Chiaretti et al., 2006; Ebeid et al., 2008). Aufgrund fehlender Patientendaten konnte die ZAP70-Expression nicht mit dem Rezidiv-Risiko und Gesamtüberleben verglichen werden. Eine Inhibition von ZAP70 könnte in Patienten mit hoher Expression zur Apoptoseinduktion beitragen, die Zellen aus der schützenden Mikroumgebung des Knochenmarks lösen und so für Chemotherapeutika sensibilisieren. Es wurde eine Vielzahl verschiedener ZAP70-Inhibitoren entwickelt (Hirabayashi et al., 2009; Sanam et al., 2009; Zhao and Caflisch, 2013), aber bisher nicht in klinischen Studien getestet. Daneben kommt auch der SYK-Inhibitor Gefitinib als ZAP70-Inhibitor infrage (Dielschneider et al., 2014).

#### 4.4.5.5 LTK

Auch die Expressionshöhe von *LTK* zeigte eine Abhängigkeit vom Reifegrad der B-ALL. Die reiferen prä B-ALLs wiesen eine durchschnittlich fünfmal höhere Expression als die sehr unreifen pro B-ALLs und eine doppelt so hohe Expression wie die cALLs. Über Aktivierung von überlebensfördernden Signalwegen könnte LTK zur Leukämieentstehung und –erhaltung beitragen. Da *LTK* hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen und besonders stark in der B-ALL exprimiert wird, stellt LTK ein gutes Ziel dar um spezifisch Leukämiezellen anzugreifen.

#### 4.4.5.6 PDGFRB

PDGFRB beeinflusst Zellproliferation, Differenzierung und Wachstum (Heldin et al., 1998). Es wurden verschiedene hämatologische Neoplasien mit Fusionen von PDGFRB beschrieben. Deren konstitutive Kinaseaktivität beugt der Zelldifferenzierung vor und steigert das Zellüberleben (Cain et al., 2007). Eine spezifische Inhibition der PDGFRB-Fusionsproteine in Patienten mit hämatologische Neoplasien oder ALL mittels Imatinib zeigte eine starke Verbesserung des Langzeit-Überlebens (Passamonti, 2014; Weston et al., 2013). Die Expression von *PDGFRB* unterschied sich zwischen den verschiedenen Proben um bis zu vier Größenordnungen. Translokationen des *PDGFRB*-Gens konnten hier auch in Patienten mit sehr starker *PDGFRB*-Expression nicht nachgewiesen werden. Da eine konstitutive Aktivierung von PDGFRB die Zelldifferenzierung einschränkt und das Zellüberleben steigert, könnte stark überexprimiertes PDGFRB auch in ALL zur Leukämieentstehung beitragen. Analog zu den Ergebnissen von *Weston et al.* bei der Behandlung kindlicher ALL mit *PDGFRB*-Translokationen könnte eine PDGFRB-Inhibition mittels Imatinib auch bei B-ALL-Patienten mit starker *PDGFRB*-Expression einen therapeutischen Effekt aufweisen. Ein Zusammenhang



von hoher *PDGFRB*-Expression mit Überleben und Therapieansprechen sollte geprüft werden.

#### 4.5 Methylierungsanalyse

Die DNA-Methylierung wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) aufrechterhalten. Eine Hypermethylierung der Promotorregion bewirkt eine dichte DNA-Verpackung, welche dann nicht mehr für Transkriptionsfaktoren zugänglich ist und dementsprechend nur gering oder gar nicht exprimiert werden kann. Veränderungen der *DNMT*-Expression in Stammzellen führen zu starken Veränderungen der DNA-Methylierung und zu einer verfrühten Differenzierung dieser. Dies legt nahe, dass Methylierungs-Dynamiken Stammzellfunktionen beeinflussen und zur Leukämogenese beitragen könnten (Bröske et al., 2009).

Viele Studien belegen, dass parallel zur globalen Abnahme der Genom-Methylierung, hunderte für den Tumor-Phänotyp entscheidende Gene eine verstärkte Methylierung ihrer Promotoren aufweisen. Dieses epigenetische Silencing ist ein stabiler Mechanismus zur Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen über Verringerung der Expression (Berdasco and Esteller, 2010; Jones and Baylin, 2007; McCabe et al., 2009). Medikamente zur Inhibition von Methyltransferasen, wie beispielsweise 5-Azacytidine, sind für die Behandlung myelodysplastischer Syndrome zugelassen und erreichen eine klinische Verbesserung in Patienten mit MDS (Gurion et al., 2010), AML (Fenaux et al., 2010) oder CML (Issa, 2007). DNA-Methylierungen scheinen hier eine grundlegende Bedeutung in der Pathogenese zu spielen. Die über DNMT-Inhibitoren induzierte Hypomethylierung bewirkt neben der Aktivierung von Tumorsuppressoren auch die Aktivierung anderer Signalwege. Da aber maligne Zellen stark vom Ausschalten bestimmter Gene abhängig sind, überwiegen zumindestens in myeloischen Erkrankungen die positiven Effekte.

Veränderungen im Methylierungsmuster von ALL-Patienten wurden bereits durch (Garcia-Manero et al., 2009) und (Nordlund et al., 2012) dokumentiert. Nach Studien von *Milani et al.* lassen sich anhand des Methylierungsmusters akut B-lymphatische von T-lymphatischen Leukämien abgrenzen und die DNA pädiatrischer T-ALLs wies einen höheren Anteil hypermethylierte DNA auf (Milani et al., 2010; Vilas-Zornoza et al., 2011). Die DNA-Methylierung ist ein genau regulierter Mechanismus zur Aktivitätskontrolle von Genen. Sowohl die Ausschaltung über Hypermethylierung als auch die Expressionserhöhung durch Hypomethylierung können zur Pathogenese beitragen.

In dieser Arbeit wurden mittels des „*EpiTect Methylation Arrays*“ (SAB Bioscience, Hilden) exemplarisch die elf Gene *ABL1*, *DDR1*, *EPHA7*, *FGFR1*, *FLT1*, *FLT3*, *FLT4*, *HCK*, *KDR*, *KIT* und *PTK7* auf den Methylierungszustand ihrer Promotorregion hin untersucht. Dieser Ansatz erlaubte einen Einblick in diesen epigenetischen Regulationsmechanismus und wie groß die

Relevanz der DNA-Methylierung für die veränderte Expression von Tyrosinkinasen adulter ALL war. Da methodisch bedingt durch den verwendeten Methylierungs-Array nicht die vollständige Promotorregion abgebildet wurde, könnten in weiterführender Untersuchungen detailliertere Kenntnisse über den Methylierungszustand interessanter Tyrosinkinase-Gene über Bisulfit-Sequenzierungen der gesamten Promotorregion gewonnen werden.

Die untersuchten Promotorabschnitte der Gene *ABL1*, *FGFR1*, *FLT3*, *FLT4*, *KIT* und *PTK7* waren in gesunden lymphatischen Zellen und ALL-Patienten vollständig unmethyliert, Expressionsveränderungen kommen hier somit nicht über Veränderungen der Methylierung zustande. Die Expression wird demnach über eine der zahlreichen anderen Möglichkeiten zur Expressionskontrolle, wie beispielsweise über Transkriptionsfaktoren oder Histonmodifikationen, reguliert.

Für die Gene *DDR1*, *FLT1* und *KDR* in B- und T-ALL und für *HCK* in T-ALL konnte die verringerte bzw. erhöhte Expression auf ein verändertes Methylierungsmuster zurückgeführt werden. Eine veränderte Methylierung in der akuten lymphatischen Leukämie beeinflusst also auch die Expression von TK-Genen.

Die ***DDR1***- und ***FLT1***-Gene, in B- und T-ALL überexprimiert, waren in den untersuchten ALL-Proben nahezu unmethyliert, während die Promotoren der Kontrollen zu etwa 40 % methyliert vorlagen. Diese Veränderung des Methylierungszustands wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Erhöhung der Expression kommt bei diesen Genen also zumindestens teilweise durch eine Reduktion der Methylierung zustande.

Eine starke Hypermethylierung wurde in dem *EPHA7*- und *HCK*-Promotor von T-ALL Patienten festgestellt. Das ***EPHA7***-Gen ist sowohl in Normalpersonen als auch in T-ALL Patienten nicht exprimiert. Während Normalpersonen keine Methylierung des *EPHA7*-Promotors zeigten, war in T-ALL-Proben dieser vollständig hypermethyliert. Laut *Oricchio et al.* könnte über Methylierung des *EPHA7*-Gens die Expression der verkürzten, tumorsuppressiven Spleißvariante *EPHA7-S* unterbunden werden (Oricchio et al., 2011). In B-ALL-Proben lag der Promotor hingegen meist unmethyliert vor. Dabei konnte eine Korrelation zwischen Methylierung und Expression festgestellt werden. Die B-ALL-Proben mit teilweiser Methylierung zeigten keine oder nur eine geringe *EPHA7*-Expression, während die vollständig unmethylierten Proben eine starke *EPHA7*-Überexpression aufwiesen.

Der Promoter des ***HCK***-Gens lag in Normalpersonen durchschnittlich zu 17 % und in T-ALL zu 81 % hypermethyliert vor. Diese verstärkte Methylierung entsprach der verringerten Expression.

Die *KDR*-Expression war in nahezu allen ALL-Proben ausgeschaltet. Der ***KDR***-Promotor lag in den Kontrollen vollständig unmethyliert vor. Von den untersuchten B-ALL-Proben zeigten

45 % eine vollständige Hypermethylierung und 40 % eine partielle Methylierung. In der T-ALL waren 90 % der Proben hypermethyliert. Die Expression von KDR in adulter ALL wird also über den Methylierungszustand des Promotors reguliert. Die Rezeptor-Tyrosinkinase KDR ist ein Marker hämatopoetischer, pluripotenter Stammzellen (Ziegler et al., 1999), welcher bei weiterer Differenzierung schnell herunterreguliert wird (Casella et al., 2003). Bisher wurden nur wachstumsfördernde Eigenschaften von KDR untersucht. Die durchgängige Methylierung und die damit verbundene Ausschaltung des *KDR*-Gens in adulter ALL wurde bisher nicht beschrieben. Inwieweit das gezielte Ausschalten dieses Gens zur ALL-Entstehung bzw. -Erhaltung beitragen könnte, müsste noch untersucht werden.

## 4.6 Wachstumsanalysen

Die Ergebnisse der Wachstumsanalysen von *FLT4*, *EPHA7* und *ERBB4* wurden im Detail in Kapitel 4.4.1.1, 4.4.2.1 und 4.4.3.1 diskutiert. Die Bestimmung der Proliferationsraten erfolgte über Quantifizierung der Zellviabilität der Zellkulturen.

Transfektionen mit den *ERBB4*-Spleißvarianten *ERBB4-JmA-CYT1* und *ERBB4-JmB-CYT1* zeigten keinen Einfluss auf das Wachstum der T-Zelllinien Jurkat und Molt 4. Da von T-ALL Patienten ausschließlich die prozessierbare JmA-Isoform gebildet wurde, könnte in weiteren Untersuchungen die Verwendung der aktiven Proteindomänen der CYT1- und CYT2-Isoformen, welche dem geschnittenen intrazellulären Anteil entsprechen, die Analyse verbessern. Transfektionen mit *EPHA7-S* und *EPHA7-FL* ergaben weder einen Hinweis auf proliferationsfördernde Eigenschaften von *EPHA7-FL* noch auf die vermuteten tumorsuppressiven Eigenschaften der *EPHA7-S* Isoform. Hier könnte der Einsatz einer konstitutiv aktiven *EPHA7*-Variante die Ergebnisse verbessern, da so eine Inaktivierung der Tyrosinkinase durch die verwendeten Zelllinien ausgeschlossen werden könnte. Die Überexpression von *FLT4* wirkte wachstumsstimulierend auf die B-ALL Zelllinie Nalm 6 und ermöglichte der murinen pro B-Zelllinie BaF3-Zellen ein IL2-unabhängiges Wachstum. *FLT4* wirkt demnach proliferationsfördernd auf B-lymphatische Leukämiezellen. Eine spezifische *FLT4*-Inhibition mittels Sorafenib konnte in den auf die *FLT4*-Überexpression angewiesenen BaF3-Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Expression in B- und T-lymphatischen ALL-Erkrankungen und der proliferationsfördernden Eigenschaften in Leukämiezellen scheint *FLT4* an der Aufrechterhaltung der hohen Proliferationsraten beteiligt zu sein und könnte unreguliertes Wachstum ermöglichen. *FLT4* sollte in den Fokus weiterer Analysen gerückt werden und könnte ein vielversprechendes therapeutisches Ziel darstellen, insbesondere da auch eine Vielzahl verschiedener *FLT4*-Inhibitoren bereits zugelassen sind.

Die Wachstumsanalyse mittels WST-1 ist insbesondere bei Einstellung der Zellkonzentrationen der verschiedenen Ansätze fehleranfällig. Werden hier unterschiedliche Zelldichten ausgesät, finden die Zellen andere Wachstumsbedingungen vor, welche einen starken Effekt auf die Proliferationsrate haben. Selbst Ungenauigkeiten einer Pipette oder Fehler bei der Zellzählung werden aufgrund der starken Verdünnungen bei Einstellung der Zellkonzentration sehr groß. Eine Wiederholung der Wachstumsanalysen mit konstitutiv aktivierten Varianten der Tyrosinkinasen würde ausschließen, dass die oftmals nur geringen Effekte auf die Proliferation nicht aufgrund von Inaktivierungen der Tyrosinkinasen im zellulären Kontext zustande kommen. Dies wurde beispielsweise für Transfektionen mit normalen und konstitutiv aktivierten BLK in BaF3-Zellen gezeigt (Petersen et al., 2014). Auch der Einsatz aktivierender Wachstumsfaktoren, wie VEGFC / VEGFD zur Aktivierung von FLT4 oder Neureguline bei ERBB4, würden zusätzliche Informationen liefern.

## 4.7 Sequenzanalysen

### 4.7.1 Sequenzpolymorphismen der Tyrosinkinasen

Mutationen innerhalb von Tyrosinkinase-Genen können deren Aktivitätszustand über verschiedene Mechanismen beeinflussen: aufgehobene Autoinhibition, Liganden-unabhängige Dimerisierung oder veränderte Bindungsaffinitäten können die Aktivität von Tyrosinkinasen erhöhen. Eine Genom-Sequenzanalyse von 1725 Patienten mit B-Vorläufer ALL auf Veränderungen im Kinom wies eine Vielzahl verschiedener Mutationen und Fusionen, u.a. in den Genen für ABL1, ABL2, CSF1R, PDGFRB, JAK1, 2, 3, FLT3, TYK2 und NTRK3 nach (Roberts et al., 2014).

Es wurden drei verschiedene Einzelnukleotidpolymorphismen detektiert. In der Tyrosinkinase-Domäne von **FLT4** führt die Variation C2670G (**rs448012**) zu einem Austausch der Aminosäure 890 von Histidin zu Glutamin. Da die Frequenz dieses SNPs sich zwischen Kontrollen und Patienten nicht signifikant unterschied, handelte es sich um einen natürlicherweise vorkommenden Polymorphismus. Der Sequenzpolymorphismus G3971T (**rs307821**) innerhalb der C-terminalen Domäne von FLT4 führt zu einem Austausch von Arginin gegen Leucin. Die C-terminale Domäne von FLT4 dient in phosphorylierter Form als Bindestelle für nachfolgende Signalproteine und ist für die Aktivität von FLT4 essentiell. Ein Aminosäureaustausch könnte über veränderte Bindungsaffinitäten nachgeschaltete Signalwege beeinflussen. Der Polymorphismus zeigte aber keinen signifikanten Unterschied der Prävalenz zwischen B- und T-ALL-Patienten und Normalpersonen.

In einer einzelnen Probe wurde eine unbekannte **FLT4**-Spleißvariante identifiziert, in der ein Teil des **FLT4**-Introns 28 in die C-terminalen Domäne eingefügt war. Dadurch kommt es zu

einer Leserahmenverschiebung assoziiert mit einem vorzeitigen Stopcodon. Die Signalweiterleitung dieser Spleißvariante ist also nur eingeschränkt möglich oder ganz unterbrochen. Da diese Variante nur in einer einzelnen ALL-Probe vorgefunden wurde, ist eine klinische Relevanz unwahrscheinlich.

Auch der Nukleotidpolymorphismus C1553T (**rs7527017**) der RTK **ROR1** zeigte keine signifikant veränderte Häufigkeit in ALL-Patienten.

Eine **FLT3-ITD** konnte nur in einer der 34 untersuchten B-ALL Proben nachgewiesen werden. Die Anwesenheit der ITD beeinflusste weder das Antigen- noch das TK-Expressionsprofil, welche denen der übrigen ALL-Proben entsprachen. Entgegen unserer Erwartung wiesen diese Zellen auch keine Expression myeloischer Antigene auf.

#### 4.7.2 Spleißvarianten

Die Bestimmung der Spleißvarianten erfolgte durch Analyse der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte. Dies ermöglicht keine absolute Quantifizierung der vorliegenden Varianten, deutliche Unterschiede waren aber gut zu erkennen. Zur genauen Bestimmung des Anteils jeder Spleißvarianten könnten diese Ergebnisse beispielsweise über den Einsatz von FRET-Sonden genauer bestimmt werden. Die Ergebnisse der Spleißvarianten-Analyse von *NTRK3*, *TYK2*, *ERBB4* und *EPHA7* werden in den entsprechenden Kapiteln der Expressionsanalyse ausführlich diskutiert.

Die *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* **LCK** spielt eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptor-Komplexes, welcher essentiell für die Thymozyten-Differenzierung und T-Zell-Aktivierung ist. Die Bindung von Antigenen und costimulierenden Signalen an den TCR induziert T-Zell-Proliferation, Zytokin-Produktion und reguliert T-Zell-Apoptose und -Überleben. Für diese Signalwirkung ist aktiviertes LCK essentiell, welches CD3 und  $\zeta$ -Ketten des TCR-Komplexes phosphoryliert und so die Bindung anderer Signalproteine ermöglicht, welche teilweise ebenfalls von LCK phosphoryliert und aktiviert werden (z.B. ZAP70) (Salmond et al., 2009). LCK *knock-out* Mäuse zeigen eine Blockade der T-Zell-Differenzierung (Talab et al., 2013). Die LCK $\Delta$ 7-Isoform, in der die ersten 51 Aminosäuren der Tyrosinkinase-Domäne fehlen, wirkt als Regulator der Volllänge-Isoform und reduziert die enzymatische Aktivität. Die Expression von LCK $\Delta$ 7-bewirkt in der T-ALL Zelllinie Jurkat eine verlangsamte Zellteilung (Germani et al., 2003).

Die LCK-Expression war in Patienten mit T-ALL durchschnittlich um das 22-fache erhöht, aber in den meisten T-ALL Proben wurde überwiegend die LCK $\Delta$ 7-Isoform amplifiziert, in den Normalpersonen hingegen überwog das Volllänge-Transkript. LCK nimmt daher in der T-ALL

im Gegensatz zu gesunden Lymphozyten nicht aktiv an der Signalübertragung des TCR teil. Die inaktive LCK $\Delta$ 7-Isoform blockiert eventuell die Differenzierung der T-Zellen.

Über alternatives Spleißen von **NTRK3** können zwei verschiedene Isoformen gebildet werden: die katalytisch aktive Volllänge-Form und eine verkürzte, inaktive Isoform (Hisaoka et al., 2002). In den untersuchten T-ALL Proben mit sehr hoher aberranter **NTRK3**-Expression lag vorwiegend das katalytisch aktive Volllänge-Transkript vor. In T-ALL Zellen kann diese katalytisch aktive Variante also verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen. Bisher ist allerdings noch unbekannt, welche Signalwege diese typischerweise in Nervenzellen exprimierte TK in Leukämiezellen beeinflussen könnte.

**TYK2** gehört zur JAK-Familie und wies sowohl in B-ALL als auch in T-ALL eine sehr starke Expression auf. Die katalytisch inaktive Spleißvariante TYK2-E971fsX67 agiert als dominant negativer Inhibitor der TYK2-Kinase. Die PCR-Analyse zeigte keine Veränderung in dem Verhältnis der beiden Isoformen zwischen Patienten und Normalpersonen, das katalytisch aktive Volllänge-Transkript stellt die dominierende Variante da. Vermutlich trägt der proliferationsfördernde TYK2-STAT1-BCL2-Signalweg zur Aufrechterhaltung der Leukämie bei.

**ERBB4** kann in vier verschiedenen Isoformen vorliegen, dabei unterscheiden diese sich in einer alternativ gespleißten Juxtamembran- (JmA und JmB) und der zytoplasmatischen (CYT1 und CYT2) Domäne. Die JmB-Isoform kann nicht prozessiert werden und der intrazelluläre Anteil (ICD) nicht freigesetzt werden; der CYT2-Isoform fehlt ein PPXY-Proteinmotiv, welches eine schnellere Degradierung des Proteins vermittelt. In den untersuchten adulten T-ALLs lag vorwiegend die CYT1-Isoform und ausschließlich die JmA-Variante vor. ERBB4 kann in T-ALL also prozessiert werden und die Freisetzung des intrazellulären Anteils die Genexpression beeinflussen. Da die CYT1-Isoform aber eine kurze Lebensdauer aufweisen soll, muss die genaue Wirkung von ERBB4-JmA-CYT1 auf T-lymphatische Leukämiezellen erst noch untersucht werden.

**EPHA7** kann als katalytisch aktive Volllänge-Isoform EPHA7-FL oder als verkürzte inaktive Variante EPHA7-S vorliegen. In B-ALL-Patienten wurde vorwiegend die Volllänge-Variante gebildet, die katalytisch inaktive Isoform nur in geringen Mengen. Somit spielen die tumorsuppressiven Eigenschaften von EPHA7-S in B-ALL keine Rolle. Welche Signalwege durch die katalytisch aktive Isoform beeinflusst werden, muss noch geklärt werden.

### 4.7.3 Translokationen

Eine Vielzahl verschiedener Translokationen bewirken eine konstitutive Aktivierung und/oder aberrante Expression von Tyrosinkinase, welche zur Tumorgenese beitragen. Neben *ABL1*, welches in verschiedenen Translokationen zur Leukämieentstehung beiträgt, sind auch insbesondere die Translokationen von *FGFR1* und *PDGFRB* mit Leukämieentstehung assoziiert.

**NUP214-ABL1**-Translokationen liegen mit einer Frequenz von etwa 5 % in T-ALL-Patienten vor. Hier konnte auch in ALL-Proben mit sehr hoher *ABL1*-Expression keine Translokation nachgewiesen werden.

Die für seltene Fälle von AML beschriebene **ETV6-NTRK3**-Translokationen konnte auch in T-ALL-Proben mit besonders starker *NTRK3*-Expression nicht nachgewiesen werden. Eine Positiv-Kontrolle zur Verifizierung der PCR lag nicht vor.

Myeloische und lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie und Abnormitäten im *PDGFRA*-, *PDGFRB*- und *FGFR1*-Gen sind eine eigene Kategorie der WHO-Klassifikation (Bain, 2010). **FGFR1**-Translokationen sind assoziiert mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen (Lee et al., 2013) und bisher sind zwölf verschiedene Fusionspartner bekannt. Die Translokationen bewirken eine konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität und sind essentiell an der Pathogenese beteiligt (Trimaldi et al., 2013). **PDGFRB**-Fusionen wurden mit 24 verschiedenen Partnern nachgewiesen und bewirkten ebenfalls eine verstärkte Expression und konstitutive Aktivierung (Cain et al., 2004). Diese haben zwar nur eine geringe Prävalenz (in weniger als 2 % der myeloproliferativen Neoplasien und in seltenen Fällen pädiatrischer ALL), sind jedoch relevant, da diese Erkrankungen ein gutes therapeutisches Ansprechen auf Imatinib zeigen (Arefi et al., 2012; Roberts et al., 2014; Tefferi and Pardanani, 2004; Weston et al., 2013). Durch die spezifische Behandlung myeloproliferativer Erkrankungen mit *PDGFRB*-Translokationen konnte das 2-Jahres Überleben von 55 % ohne Imatinib auf ein 10-Jahres Überleben von 90 % mit Imatinib erhöht werden (Passamonti, 2014). Um eine optimale Behandlung zu ermöglichen, sollten auch in ALL die seltenen Fälle mit *PDGFRB*-Translokationen bestimmt werden.

Mittels Langstrecken-inverser (LDI) PCR konnten keine Translokationen der Gene *PDGFRB* und *FGFR1* nachgewiesen werden. Da in PCR-Reaktionen bevorzugt das kleinere Produkt amplifiziert wird, können nur Translokationen nachgewiesen werden, welche nach Restriktionsverdau und Zirkularisierung genomischer DNA ein kleineres oder ähnlich großes Produkt bilden wie der Wildtyp. Dies trifft auch auf die *FGFR1OP2-FGFR1* Translokation der AML-Zelllinie KG1a zu, in welcher nur die Kontrollbande amplifiziert werden konnte. Auch

wenn mittels LDI-PCR keine Translokationen nachgewiesen werden konnten, sind *PDGFRB*- und *FGFR1*-Translokationen nicht ausgeschlossen.

#### **4.8 Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Behandlung akuter lymphatischer Leukämien**

Es können drei verschiedene Typen von Inhibitoren unterschieden werden. Dasatinib gehört zu den Typ 1 Inhibitoren, welche die aktive Konformation der Kinase binden, während Typ 2 Inhibitoren wie Imatinib, Nilotinib und Ponatinib die inaktive Konformation stabilisieren und so deren Aktivierung verhindern. Typ 3 Inhibitoren sind allosterische Inhibitoren, welche an regulative Domänen binden und hoch selektiv sind. Ein Problem bei der Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren stellt die Entwicklung von Resistenzen dar. Daher stehen mittlerweile für die Behandlung BCR-ABL-positiver Leukämien neben Imatinib (Glivec; Novartis) noch eine Vielzahl anderer TKI zur Verfügung. Die wichtigsten sind Dasatinib (Sprycel; Bristol-Myers Squibb), welches gegen viele mutierten ABL1-Varianten aktiv ist und ebenfalls sehr gute Behandlungsergebnisse zeigte, Nilotinib (Tasigna; Novartis) und Ponatinib (Iclusig; Ariad Pharmaceuticals). Da ABL1 auch in nahezu allen adulten ALL-Patienten verstärkt exprimiert wird, könnte eine Inhibition mit einem der beschriebenen TKI eventuell auch zur Therapie bei BCR-ABL-negativen Patienten beitragen. Daneben sind insbesondere die Tyrosinkinasen FLT3, FLT4 und PTK2B interessante Ziele, deren onkogene Wirkung belegt ist und die auch in ALL stark exprimiert werden. Darüber hinaus könnte die Inhibition von SFKs zum Behandlungserfolg beitragen, da die SRC-Kinasen *BLK*, *LCK*, *SRC* und *YES1* eine 4 – 21-fache Überexpression in ALL aufwiesen. Da SRC-Kinasen wichtig für die Erhaltung der Leukämie-Stammzellen in AML und bei der Proliferation von ALL-Zellen sind, zudem unerlässlich für die leukämogene Wirkung von BCR-ABL in ALL sind und eine abnormale Aktivität von SFKs mit Imatinib- und Dasatinib-Resistenzen korreliert, stellen diese vielversprechende therapeutische Ziele dar. Der Einsatz von TK-Inhibitoren, welche gleichzeitig ABL1 und SFKs inhibieren, könnte helfen Resistenzen zu überwinden.

Es sind eine Vielzahl verschiedener Multi-Kinase-Inhibitoren, welche gleichzeitige mehrere TK inhibieren, zugelassen oder befinden sich in klinischen Testverfahren. Für die Behandlung von ALL potentiell infrage kommende Multi-TKI, welche in B- oder T-ALL verstärkt exprimierte Tyrosinkinasen inhibieren, sind nachfolgend genauer beschrieben. Eine Zusammenfassung der verschiedenen bereits zugelassenen und in klinischer Testung befindlichen Tyrosinkinase-Inhibitoren und deren Ziel-Tyrosinkinasen ist Tabelle 1-5 und Tabelle 1-6 zu entnehmen.

Die breiteste Wirkung gegen verschiedene Tyrosinkinasen weist **Dasatinib** auf. Unter anderem inhibiert es die in B-ALL überexprimierten Kinasen ABL1, BLK, DDR1, EPHA7,



PDGFRB, PTK2, SRC, TEC, TYK2 und die in T-ALL überexprimierten TK ABL1, ERBB4, SRC, TEC, TYK2 und YES1 (Greuber et al., 2013; Hantschel et al., 2008). Dasatinib zeigte über die gleichzeitige Inhibition von ABL1 und SFKs bei BCR-ABL-positiver ALL einen guten Behandlungserfolg (McCormack and Keam, 2011) und könnte auch eine therapeutische Option in BCR-ABL-negativer ALL darstellen. Dasatinib findet bereits Anwendung in verschiedenen soliden Malignomen und in Leukämien und die Verträglichkeit ist über eine große Anzahl von Studien belegt (Gnoni et al., 2011).

**Sunitinib** und **Sorafenib**, welche zur Behandlung von Nierenzellkarzinomen eingesetzt werden (Fiedler et al., 2015; Izzedine et al., 2007; Serve et al., 2013), könnten ebenfalls eine Therapieoption darstellen, da diese FLT1, FLT3, FLT4 und PDGFRB inhibieren, welche in B- und T-lymphatischer ALL eine sehr hohe Expression aufweisen. Konstitutiv aktiviertes FLT3 und PDGFRB trägt zur Leukämogenese bei und die proliferationsfördernde Eigenschaften von FLT4 wurden im Rahmen dieser Arbeit belegt. Auch aberrant aktiviertes FLT1 fördert sowohl in AML- als auch in ALL-Zellen Zellüberleben, Proliferation und Migration.

**Ponatinib** inhibiert ebenfalls ein breites Spektrum von Kinasen, welche in ALL überexprimiert werden: ABL1, die VEGF-Rezeptoren FLT1 und FLT4, BLK, CSK und SRC und die in T-ALL verstärkt exprimierten TK FGFR1 und YES1. Aufgrund des guten Wirkungsspektrums für T- und B-Linien ALLs könnte der Einsatz von Ponatinib eine therapeutische Option darstellen. Da bei Ponatinib-Behandlung gehäuft arterielle und venöse Thrombosen und Embolien festgestellt wurden, wird dieser TK-Inhibitor jedoch nicht als "first line" Therapeutikum eingesetzt. Diese Nebenwirkung könnten durch kontrollierte Blutverdünnung und einer Minimierung des Ponatinib-Einsatzes reduziert werden (Sanford et al., 2015).

**Linifanib** inhibiert u.a. die VEGF-Rezeptoren FLT1 und FLT4 sowie FLT3 und PDGFRB. Andere Tyrosinkinasen werden vergleichsweise gering inhibiert (Aversa et al., 2015; Shankar et al., 2007). Daher wäre auch dieser TK-Inhibitor in der Behandlung von ALL interessant.

**Imatinib** wird hauptsächlich zur Behandlung BCR-ABL-positiver CML und ALL eingesetzt. Imatinib inhibiert u.a. die verstärkt exprimierten Kinasen ABL1, DDR1 und PDGFRB (Kolb et al., 2003; Hunter, 2007).

**Nilotinib**, welches ebenfalls bei CML eingesetzt wird, zeigt ein ähnliches Wirkungsspektrum mit Inhibition von KIT, DDR-, ABL- und PDGF-Rezeptoren (Blay and von Mehren, 2011) und ist somit vorallem bei der Behandlung der B-Linien ALL interessant.

**Bosutinib** ist ein Inhibitor von SRC-, PDGFR- und ABL-Kinasen. Er ist gegenüber verschiedenen ABL1-Mutationen wirksam, welche Resistenzen zu Dasatinib und Imatinib vermitteln. Bosutinib ist für die Behandlung von CML zugelassen, zeigt eine hohe klinische Effizienz, gute Tolerierbarkeit und reduzierte Toxizität (Rassi and Khoury, 2013).

**Canertinib** inhibiert alle ERBB-Kinasen (Slichenmyer et al., 2001) und zeigte vielversprechende pro-apoptotische Eigenschaften in der T-ALL-Zelllinie Jurkat. Zudem

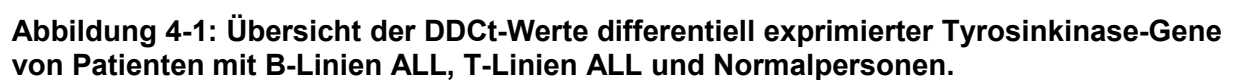
inhibiert Canertinib neben ERBB4 auch die Kinasen AKT, ERK1/2 und ZAP70, reduziert die Expression der ebenfalls stark überexprimierten Tyrosinkinase *LCK* und aktiviert Apoptose-Signalwege (Trinks et al., 2011). Dieser Inhibitor wird in verschiedenen klinischen Studien solider Tumore getestet und könnte auch für T-ALL mit abnormer Expression von ERBB4 und *LCK* eine Verbesserung der Therapie bewirken.

Neben Multi-Kinase-Inhibitoren stellen auch die selektiven Tyrosinkinase-Inhibitoren eine Möglichkeit dar, die Therapie zu verbessern. Da in bisherigen Studien TKI als Monotherapeutikum nur selten eine gute Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte, erscheint ein kombinierter Einsatz mit Standard-Chemotherapie sinnvoller. Über Patienten-spezifische Therapien und der gezielten Inhibition von TK, welche nur von Leukämiezellen hoch exprimiert werden, kann der Einsatz stark zytotoxischer Chemotherapeutika reduziert werden und so das Gesamtüberleben vor allem bei älteren Patienten verbessert werden.

#### **4.9 Zusammenfassung**

Da das 5-Jahres Überleben adulter ALL-Patienten trotz intensiver Therapie nur bei etwa 47 % liegt, besteht hier ein besonderes Interesse an der Identifizierung neuer therapeutischer Ziele. Dabei sind Tyrosinkinasen von besonderer Relevanz, da Veränderungen der TK-Aktivität bereits für viele maligne Erkrankungen beschrieben wurden und diese selektiv inhibiert werden können. Die große Anzahl bereits zugelassener und in klinischen Studien befindlicher TK-Inhibitoren ermöglicht eine an die vorliegenden onkogenen Veränderungen angepasste, Patienten-spezifische Therapie. Über den Einfluss der verschiedenen Tyrosinkinasen auf die Entwicklung adulter ALL ist noch wenig bekannt und ein Überblick über das vollständige Tyrosin-Kinom wurde bislang nicht erhoben. In dem untersuchten Patientenkollektiv adulter ALL zeigten 45 der 86 untersuchten Tyrosinkinasen entweder in B-ALL, T-ALL oder in beiden ein signifikant verändertes Expressionsprofil.

Dabei stellen die Tyrosinkinasen *ABL1*, *DDR1*, *EPHA7*, *FGFR1*, *ERBB4*, *FLT1*, *FLT3*, *FLT4*, *LTK*, *PTK2*, *PTK2B*, *PTK7*, *TEC* und *TYK2* die vielversprechendsten therapeutischen Ziele dar, welche in detaillierteren Analysen weiter untersucht werden sollten. Die onkogene Wirkung der Tyrosinkinasen *FLT3* und *PTK2B* ist belegt und auch die Inhibition der in ALL überexprimierten SRC-Kinasen *BLK*, *LCK*, *SRC* und *YES1*, welche wichtig für die Erhaltung der Leukämie-Stammzellen in AML sowie für die Proliferation von ALL-Zellen sind und Resistenzen gegenüber TKI vermitteln, scheint vielversprechend zu sein.



Die Gene *EPHA7* und *PTK2* konnten als mögliche Marker für B-Linien ALL und die Gene *NTRK3*, *ERBB4* und *ZAP70* als Marker für T-Linien ALL identifiziert werden. Die Expressionsstärke von *ZAP70* und *LTK* zeigte in B-ALL eine Assoziation mit dem Reifegrad der Leukämie.

Neben den in allen ALL-Proben verstärkt exprimierten Tyrosinkinasen zeigten einige TK variierende Expressionen zwischen den verschiedenen Patienten. Inwieweit dies Rückschlüsse auf die prognostische Relevanz erlaubt, müssten nachfolgende prospektive Untersuchungen an einem umfassenden Patientenkollektiv klären. Dabei sollten die Expressionshöhe dieser Tyrosinkinasen mit Therapieansprechen, Rezidivrate und Langzeitüberleben verglichen werden, welche hier leider nicht zur Verfügung standen. Dies könnte eine exaktere Risikostratifizierung ermöglichen, wie es beispielsweise bereits für *ZAP70* in B-Vorläufer-ALL beschrieben wurde. Auch die hier festgestellte geringere Expression von sechs Tyrosinkinasen in thymischer T-ALL könnte im Zusammenhang mit der vergleichsweise besseren Prognose thymischer T-ALLs stehen. Darüber hinaus wäre eine Analyse der hier als potentiell leukämogen identifizierten Tyrosinkinasen in pädiatrischer ALL als häufigste maligne Erkrankung des Kindesalters oder auch in AML interessant. Der anhand unserer Daten erhobene umfassende Überblick über das Tyrosinkinase-Expressionsprofil liefert die notwendige Basis für weiterführende detailliertere Untersuchungen in adulter ALL. Die veränderten Tyrosinkinasen-Expressionen, welche an der ALL-Entstehung beteiligt sein könnten, sind in Abbildung 4-1 nochmals zusammengefasst abgebildet.

### **Verstärkt exprimierte Tyrosinkinasen mit proliferationsfördernder Wirkung**

Die Tyrosinkinasen *ABL1*, *FLT4*, *PTK7* und *TEC* sind in B- und T-ALL verstärkt exprimiert. Die proliferationsfördernde Wirkung von **FLT4** in Leukämiezelllinien wurde hier über Wachstumsanalysen und die Überwindung des IL2-abhängigen Wachstums von BaF3-Zellen belegt. Weitere Studien zeigten eine aktivierte leukämische Zellproliferation nach Bindung des Liganden VEGF-C und eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika. Da die *FLT4*-Expression auf lymphatische Endothelzellen begrenzt ist, hätte eine spezifische Inhibition, beispielsweise über den TKI SAR131675, vermutlich geringere Nebenwirkungen. FLT4 kann weiterhin aber auch durch verschiedene Multikinase-Inhibitoren inhibiert werden. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften sollte FLT4 in den Fokus weiterer Analysen gerückt werden. Eine leukämogene Wirkung und Proliferationssteigerung von aktivierten **ABL1** ist für ALL- und CML-Zellen belegt. Zur Inhibition stehen verschiedene TK-Inhibitoren zur Verfügung, beispielsweise Imatinib, Dasatinib, Ponatinib und Nilotinib, welche bereits bei CML und ALL mit konstitutiv aktivierter ABL1-Kinase eingesetzt werden. **PTK7** fördert die Zellmigration leukämischer Zellen und steigert die Apoptoseresistenz. In AML ist eine hohe *PTK7*-Expression mit Anthrazyklin-Resistenzen assoziiert, eine Inhibition von PTK7 könnte

diesen entgegenwirken. Aufgrund der ebenfalls hohen *PTK7*-Expression in Stammzellen kann die Theorie aufgestellt werden, dass *PTK7* den Leukämiezellen Stammzell-Eigenschaften vermittelt. Da *PTK7* nur eine Pseudo-TK-Domäne besitzt, sind allerdings typische TK-Inhibitoren unwirksam. Eine Inhibition müsste über spezifische Antikörper erfolgen, welche die Dimerisierung oder das Schneiden der Ektodomäne verhindern. **TEC** ist sowohl in die B- als auch in die T-Lymphozyten-Aktivierung und –Entwicklung involviert und wurde ebenfalls von Stammzellen und ALL-Zellen sehr stark exprimiert. Eine Inhibition könnte über Dasatinib oder Inhibitoren der TEC-Familien erfolgen.

In der B-Linien ALL überexprimierte potentielle therapeutische Ziele sind die Tyrosinkinasen *FLT3*, *EPHA7* und *LTK*. Für **FLT3** ist die leukämogene Wirkung belegt, es spielt eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese, eine konstitutive Aktivierung vermittelt Wachstumssignale und wirkt anti-apoptotisch. *FLT3*-ITDs gehören zu den häufigsten Veränderungen in AML und auch eine erhöhte Expression beeinflusst die Proliferation. Eine Inhibition ist über eine Vielzahl verschiedener TK-Inhibitoren möglich. Klinische Studien zeigten eine Verbesserung des Therapieansprechens auch bei AML-Patienten mit hoher Expression der *FLT3*-Wildtypform, wenn eine Kombination von Standard-Chemotherapeutika und *FLT3*-Inhibitoren eingesetzt wurde. **EPHA7** wird einerseits eine Rolle als Tumorsuppressor und andererseits als Proto-Onkogen zugeschrieben. Dies hängt wahrscheinlich von der exprimierten Isoform ab und muss erst noch abschließend geklärt werden. Von den B-lymphatischen ALL-Zellen wurde vor allem die potentiell onkogene Volllänge-Isoform exprimiert. Trotz der unveränderten Wachstumseigenschaften *EPHA7*-transfizierter Leukämiezelllinien sollte *EPHA7* aufgrund der gänzlich unbekannten Wirkung der aberranten Expression in B-ALL weiter untersucht werden. **LTK** aktiviert wachstumsfördernde und anti-apoptotische Signalwege in hämatopoetischen Zellen. Bisher wurde ein Zusammenhang mit Leukämien nicht untersucht und spezifische Inhibitoren stehen nicht zur Verfügung.

Speziell in der T-Linien ALL überexprimiert sind die Tyrosinkinasen *ERBB4*, *FGFR1*, *TYK2*, *NTRK3* und *ZAP70*. Die Eigenschaften von **ERBB4** hängen stark von der vorliegenden Isoform ab. Die von den ALL-Patienten exprimierte JmA-Isoform, setzt nach der Prozessierung durch Metalloproteasen ein intrazelluläres Fragment (ICD) frei, welches als transkriptioneller Coaktivator verschiedener Gene wirkt und das Zellüberleben fördert. Die *CYT1*-Isoform soll das Zellwachstum inhibieren und *CYT2* die Proliferation steigern. In den untersuchten ALL-Patienten wurden beide Isoformen, aber vorwiegend die *CYT1*-Isoform gebildet. Der Einfluss der *CYT1*-ICD auf das Wachstum leukämischer Zellen bleibt unklar, die Wachstumsanalysen erlaubten keinen weiteren Einblick in die Funktion von *ERBB4* in Leukämiezellen. Eine Inhibition ist über Lapatinib oder Canertinib möglich. Eine erhöhte **FGFR1**-Expression ist

assoziiert mit gesteigerter Proliferation und Zellüberleben. In Fusionsproteinen konstitutiv aktiviertes FGFR1 ist essentiell an der Entstehung des myeloproliferativen Syndroms beteiligt. In allen T-ALL-Proben war FGFR1 verstärkt exprimiert, in der B-ALL variierte die Expression. Neben den spezifischen FGFR-Inhibitoren kann FGFR1 auch über Ponatinib inhibiert werden. Die **TYK2**-Expression war in allen ALL-Proben, aber besonders stark in der T-ALL, erhöht. TYK2 wirkt über die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs proliferationsfördernd. T-ALL-Zellen sind vom TYK2-STAT1-BCL2 Signalweg abhängig, welcher über eine Hochregulation des anti-apoptotischen Proteins BCL2 Zellüberleben vermittelt. Die Wirkung der aberrant hohen Expression von **NTRK3**, welches normalerweise in hämatopoetischen Zellen nicht exprimiert wird, ist unklar. Inhibitoren für TYK2 und NTRK3 befinden sich in der Entwicklung. **ZAP70** ist an der Signalweiterleitung des aktivierten T-Zell-Rezeptors beteiligt und essentiell für die T-Zell-Entwicklung und -Aktivierung. Eine Inhibition der dysregulierten ZAP70-Signalwege könnte das Wachstum leukämischer T-Zellen begrenzen.

### **Verstärkt exprimierte Tyrosinkinasen in Interaktion mit der Knochenmark-Mikroumgebung**

Im Knochenmark wird die hämatopoetische Entwicklung der Stromazellen des Knochenmarks (BMSCs) über Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und zellulärer Adhäsion reguliert. Die Stammzellnische des Knochenmarks bietet speziell für Stammzellen eine Umgebung, welche diese vor Apoptose schützt, die Selbsterneuerung und das Überleben reguliert. Die Bindung von Leukämiezellen an zelluläre und extrazelluläre Matrixkomponenten des Knochenmarkstromas kann Apoptose verhindern sowie Proliferation und Chemotherapeutika-Resistenzen steigern. Auch bei minimalen Resterkrankungen (MRD), die einen schlechten prognostischen Faktor darstellen und zur Rezidiv-Entwicklung führen, ist die Knochenmark-Mikroumgebung entscheidend an dem Chemotherapie-Überleben persistierender Leukämiezellen beteiligt. Umgekehrt werden die Stromazellen des Knochenmarks durch Leukämiezellen beeinflusst, so dass diese eine vorteilhaftere Mikroumgebung mit Sekretion abweichender Zytokine bilden, welche verstärkt Zellproliferations- und Wachstumssignale vermitteln. Diese Stammzellnischen vermitteln leukämischen Stammzellen (LSCs) die Zellzyklusphase der Quieszenz, eine verringerte Mobilität und die Expression anti-apoptotischer Proteine. Daher zeigen LSCs erhöhte Resistenzen gegenüber zytotoxischen Chemotherapeutika und sind vor Apoptose geschützt (Lane et al., 2009). Eine Unterbrechung dieser Stromazell-Interaktionen könnte die Leukämie-erhaltene Population der LSCs mobilisieren, in den Zellzyklus eintreten lassen und dadurch sensibler gegenüber der Chemotherapie machen und somit die Rezidivrate senken. Eine Verringerung der Stromazell-Interaktion könnte auch die durch Imatinib-Behandlung induzierte gesteigerte überlebensfördernde Signaltransduktion von BMSCs zu den Leukämiezellen

verringern. Auf Imatinib-Behandlung hin exprimieren BMSCs in CML vermehrt Botenstoffe, Adhäsionsmoleküle und weitere für das Zellüberleben essentielle Faktoren und ermöglichen so den Leukämiezellen der Chemotherapie zu entgehen (Mallampati et al., 2015). Eine Unterbrechung der Interaktionen von Leukämie- mit Stromazellen ist also auch für die Behandlung therapieinduzierter Resistenzen interessant.

An Interaktionen der verschiedenen Blutzellen mit Stromazellen oder der extrazellulären Matrix des Knochenmarkes sind neben vielen anderen Proteinen auch die Tyrosinkinasen EPHB4, DDR1, FLT1, PTK2, PTK2B und ZAP70 beteiligt. Diese könnten die Adhäsion an Stromazellen oder an die extrazelluläre Matrix des Knochenmarks steigern und somit zur Resistenzvermittlung beitragen und die Wahrscheinlichkeit für Rezidive erhöhen.

Der in B-ALL-Patienten oftmals hoch exprimierte **EPHB4**-Rezeptor steigert die Adhäsion an Stromazellen und könnte über Antikörper oder den Tyrosinkinasen-Inhibitor NVP-BHG712 inhibiert werden. **DDR1**, ebenfalls in B-ALL stark erhöht, reguliert die Zelladhäsion an Kollagene der extrazellulären Matrix und aktiviert über verschiedene Signalwege das Zellüberleben. Eine Inhibition ist über die Multikinase-Inhibitoren Sorafenib, Sunitinib, Dasatinib und Bafetinib oder über den DDR1 selektiven Inhibitor DDR1-IN-1 möglich. **FLT1**, welches in den meisten ALL-Patienten sehr hoch exprimiert war, beeinflusst neben der Hämatopoese auch die Knochenmarklokalisation der Leukämiezellen, was einen erheblichen Einfluss auf das Überleben der ALL-Zellen zu scheinen hat und den Austritt der Zellen aus dem Knochenmark beeinflusst. Eine FLT1-Inhibition im ALL-Maus-Modell fördert das Überleben. Eine Inhibition von FLT1 kann über verschiedene Multikinase-Inhibitoren erfolgen. **PTK2**, in der B-Linien ALL erhöht, reguliert die Dynamik fokaler Adhäsionskomplexe und somit die Loslösung oder Festigung der Zellkontakte zur extrazellulären Matrix. In AML korrelieren erhöhte **PTK2**-Expressionen mit schlechter Prognose und gesteigerten Resistenzen und PTK2 ist essentiell an der Leukämogenese BCR-ABL-positiver Zellen beteiligt. Darüber hinaus beeinflusst PTK2 eine Vielzahl verschiedener Signalwege und eine Inhibition steigert die Apoptose. Die hohe Expression von **PTK2** in B-ALL könnte also zu einer Verstärkung der Proliferation und einer Verringerung der Apoptose beitragen und leukämischen Stammzellen das Überleben ermöglichen. Eine Inhibition von PTK2 mittels VS-4718 zeigte in AML anti-leukämische Effekte *in vitro* und *in vivo*. Eine hohe **PTK2B**-Expression ist u.a. assoziiert mit einer verstärkten Zelladhäsion. Eine Inhibition verringert die Zelladhäsion und könnte über Freisetzung leukämischer Zellen aus der KM-Mikroumgebung die Rezidiv-Entwicklung und erhöhte Chemotherapeutika-Resistenzen reduzieren. Die Inhibition von PTK2B, beispielsweise über PF4618433, stellt eine sehr vielversprechende therapeutische Option bei der Behandlung akuter lymphatischer Leukämie dar. In der B-ALL könnte die gleichzeitige Inhibition von PTK2, z.B. über die Inhibitoren PF-562,271, PF-573,228 oder VS-718 die

inhibitorische Wirkung verstärken. Für **ZAP70**, in T-ALL hoch und in B-ALL sehr unterschiedlich stark exprimiert, konnte in CLL-Zellen eine Korrelation zwischen ZAP70-Expression und Stromazell-Adhäsion nachgewiesen werden, welche das Überleben steigert, Schutz vor Chemotherapeutika bietet und mit einer schlechten Prognose verbunden ist. In B-Linien ALL korreliert die Höhe der ZAP70-Expression mit dem Rezidiv-Risiko, Untersuchungen in der T-ALL existieren bisher nicht. Demnach könnte eine ZAP70-Inhibition in B-ALL-Patienten mit hoher Expression und eventuell auch bei T-ALL Patienten eine therapeutische Option darstellen.

Die gezielte Inhibition von Tyrosinkinase, welche nur von Leukämiezellen hoch exprimiert werden, würde eine passende, Patienten-spezifische Therapie ermöglichen. Bei guter Wirksamkeit der TKI könnte der Einsatz stark zytotoxischer Chemotherapeutika reduziert und so das Gesamtüberleben verbessert werden.



## 5 SCHLUSSFOLGERUNG

Trotz intensiver Therapie liegt das Gesamtüberleben von adulten ALL-Patienten nur bei etwa 50 %. Um das Überleben zu verbessern, ist es wichtig neue therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Erkenntnisse über das Expressionsprofil des Tyrosin-Kinoms spielen einerseits als therapeutischer Ansatz im Sinne einer spezifischen Inhibition von Tyrosinkinase-Rezeptoren und andererseits als prognostische Marker in der Risikostratifizierung eine wichtige Rolle.

Rezeptor-Tyrosinkinasen vermitteln extrazelluläre Signale in das Zellinnere und zytoplasmatische Tyrosinkinasen sind wichtiger Bestandteil von Signalkaskaden. Sie sind u.a. an der Regulation von Zellzyklus, Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben beteiligt. Dysregulationen zellulärer Prozesse über veränderte Expressionsprofile finden sich bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen und über Mutationen oder Translokationen konstitutiv aktivierte Tyrosinkinasen sind oftmals maßgeblich an der Leukämieentwicklung beteiligt. Somit bilden Tyrosinkinasen einen wichtigen Ausgangspunkt in der Entwicklung sogenannter Target-spezifischer Medikamente und eine Vielzahl verschiedener Tyrosinkinase-Inhibitoren werden bereits in der klinischen Routine eingesetzt.

Der Einfluss der 86 Tyrosinkinasen hinsichtlich Genese und Aufrechterhaltung der adulten ALL ist weitestgehend unklar und eine systematische Analyse des gesamten Tyrosin-Kinoms bei adulter ALL wurde bisher nicht erhoben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des gesamten Tyrosin-Kinoms untersucht und verschiedene funktionelle Analysen durchgeführt, welche als Basis für die Entwicklung individualisierter, Patienten-spezifischer Therapien in adulter ALL dienen.

Die Mehrheit der Tyrosinkinasen zeigte in ALL starke Abweichungen vom Expressionsprofil gesunder hämatopoetischer Zellen. Diese kamen in einigen Tyrosinkinasen über Hyper- oder Hypomethylierungen der Promotor-DNA zustande. Von den Tyrosinkinasen mit aberranter Expression stellen die Tyrosinkinasen ABL1, DDR1, EPHA7, FGFR1, ERBB4, FLT1, FLT3, FLT4, LCK, LTK, PTK2, PTK2B, PTK7, SRC, TEC und TYK2 die vielversprechendsten therapeutischen Ansatzpunkte dar. Proliferations-fördernde und/oder Apoptose-inhibierende Eigenschaften im hämatopoetischen System wurden bereits in der Literatur für die in unseren Versuchsreihen sehr hoch exprimierten Tyrosinkinasen ABL1, FLT3, FGFR1, LTK, PTK7 und TYK2 beschrieben. Die Tyrosinkinasen LCK, TEC und ZAP70 sind wichtig für die Entwicklung hämatopoetischer Zellen, eine Dysregulation dieser könnte die Leukämieentstehung begünstigen. Die Tyrosinkinasen DDR1, FLT1, PTK2, PTK2B und ZAP70 beeinflussen nach verschiedenen Studien die Interaktionen mit den Knochenmark-Stromazellen oder der extrazellulären Matrix. Eine Inhibition dieser proleukämischen Interaktion könnte zu einer

Verminderung von Chemotherapeutika-Resistenzen und verringertem Rezidiv-Risiko beitragen.

Exemplarisch wurde der Einfluss einzelner klinisch etablierter sowie experimentell verfügbarer Inhibitoren auf ALL-Zelllinien mit Überexpression einzelner Tyrosinkinasen untersucht. Dabei wurde dem in B- und T-ALL stark überexprimierten FLT4 erstmals eine proliferationsfördernde Wirkung auf leukämische Zellen nachgewiesen, welche durch den Einsatz des Tyrosinkinase-Inhibitors Sorafenib wieder aufgehoben wurde. Eine exaktere Einordnung der bisher noch nicht beschriebenen, aberrant hohen Expressionen von ERBB4, EPHA7 und NTRK3 in leukämischen Zellen war anhand der gewonnen Ergebnisse nicht möglich.

Potentielle Marker stellen die Gene EPHA7 und PTK2 für B-Linien ALL und NTRK3, ERBB4 und ZAP70 für T-Linien ALL dar. Die interindividuell differente Expression der Tyrosinkinasen EPHA3, EPHB3, KIT, ZAP70 und PDGFRB ermöglicht mutmaßlich eine exaktere Risikoklassifizierung, da diese das Überleben leukämischer Stammzellen, die Graft-versus-leukemia Reaktionen bei Stammzelltransplantationen und/oder die Rezidiventwicklung beeinflussen.

Anhand des veränderten Expressionsmusters in ALL ermöglichte unsere Studie die Selektion neuer möglicher Therapieziele und Marker der Risikostratifizierung aus dem bisher größtenteils nicht näher untersuchten Tyrosin-Kinom. Die im vorangegangenen spezifizierten Ergebnisse bilden die Basis für hierauf aufbauende Untersuchungen zur genaueren Analyse des Zusammenhangs zwischen Expressionsmuster und Therapieansprechen, Rezidivraten sowie Langzeitüberleben. Zur Therapieoptimierung sollte die Inhibition der als potentielle therapeutische Ziele identifizierten Tyrosinkinasen zunächst in weiteren Zellkulturen sowie Tier-experimentellen Modellen genauer untersucht werden. In einem nächsten Schritt könnte dann die Wirkung einer Inhibition in klinischen Studien an ALL-Patienten getestet werden. Im Gegensatz zu konventionellen Chemotherapeutika ermöglicht der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren einen individualisierten Therapieansatz, welcher mit einem positiven Effekt auf das Nebenwirkungsprofil und Remissionsraten assoziiert sein kann.

## 6 MATERIAL und METHODEN

### 6.1 DNA- und RNA-Techniken

#### 6.1.1 Aufreinigung von DNA

##### 6.1.1.1 Isolierung von hochmolekularer DNA mittels *Puregene* (Qiagen)

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mittels des „*Puregene*“-Kits von Qiagen (Hilden) entsprechend den Herstellerangaben. Dabei wurden zur DNA-Isolierung  $3 \times 10^6$  Zellen eingesetzt.

##### 6.1.1.2 DNA-Aufreinigung mittels *PCR Purification Kit* (Qiagen)

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels des „*PCR Purification*“-Kits von Qiagen (Hilden) gemäß den Herstellerangaben

##### 6.1.1.3 Phenol-Extraktion

Zur Phenol-Extraktion wurde die DNA-Lösung 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und mittels des „*MaXtract High Density*“-Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Ethanol-Fällung der DNA.

##### 6.1.1.4 Ethanol-Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit dem Glykogen, NaAcetat und EtOH gemischt und über Nacht oder mindestens zwei Std. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend erfolgte für 15 min eine Zentrifugation bei 10800 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 200  $\mu\text{l}$  70 %igen EtOH resuspendiert und nochmals für 15 min bei 10800 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und 10 min bei RT getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 35  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  dest. für mindestens 60 min gelöst.

**Tabelle 6-1: Pipettierschema Ethanol-Fällung**

Komponente	Volumen
DNA-Lösung	variabel
Glykogen (1 M)	1 $\mu\text{l}$
NaAcetat (1 M, pH 5,2)	1/10 Vol
EtOH 100%	2,5 Vol
EtOH 70%	200 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$ dest.	35 $\mu\text{l}$

### 6.1.2 RNA-Isolierung

RNA wurde mithilfe des Reagenz TRIzol® (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Schwerte) oder dem „NucleoSpin® RNA II“-Kit (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

Zur TRIzol-Isolierung wurden  $5-10 \times 10^6$  Zellen, im „NucleoSpin® RNA II“-Kit maximal  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt.

### 6.1.3 DNA- und RNA-Quantifizierung

Zur Konzentrationsbestimmung wird die Absorption der Purin- und Pyrimidin-Basen im Bereich von 260 nm ausgenutzt. Ein Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA-Lösung ergeben Extinktionsmessung bei 280 nm und 230 nm. DNA-Lösungen sollten ein E260/E280-Verhältnis im Bereich von 1,8 - 2,0 aufweisen, niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Ethanol/Phenol hin.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem NanoDrop von ThermoFisher Scientific (Schwerte). Dazu wurde zunächst der Nullwert durch Messung der Extinktion von Wasser oder des verwendeten Puffers eingestellt, anschließend wurden 1,5 µl der DNA- und RNA-Lösungen auf den Sockel des NanoDrops aufgetragen und die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 230 nm gemessen.

### 6.1.4 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Das Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung einzelner Reaktionsschritte, wodurch ein DNA-Fragment exponentiell vermehrt wird. Der Zyklus beginnt mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs in die Einzelstränge bei Temperaturen zwischen 90°C bis 95°C. Nach diesem Schritt folgt die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge (*Annealing*). Die Hybridisierungstemperatur wurde abhängig von der Art der eingesetzten DNA und der Schmelztemperatur der Primer zwischen 55°C und 65°C variiert. Als Standard wurde ein Programm mit 1 min Denaturierung bei 94°C, 30 s Hybridisierung und 1 min Elongation pro 1000 bp zu amplifizierender DNA bei 72°C für 35 Zyklen verwendet. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden über Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

**Tabelle 6-2: Beispiel Pipettierschema einer PCR**

Komponente	Volumen pro Reaktion [µl]	Endkonzentration im Ansatz
HotStart PCR Mastermix 2x, Qiagen	25	1x
nach Bedarf: 5x Enhancer, Qiagen	10	1x
10µM "forward"-Primer	1	0,1 µM
10µM "reverse"-Primer	1	0,1 µM
Template	variabel	0,2 - 0,5 µg
Aqua bidest., steril	ad 50	-

**Tabelle 6-3: Beispiel PCR-Programm**

Programmschritt	Dauer	Temperatur [°C]	
Denaturierung	15 min	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	95°C	30-35 Zyklen
Primer-Anlagerung	30 sec	56°C	
Elongation	60 sec	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1 Zyklus

Die PCR-Reaktionen erfolgten im Geneamp PCR System 2700 ABI Thermal Cycler (Applied Biosystems, Darmstadt), 2400 Geneamp PCR System (Perkin Elmer, Rodgau) oder im Gradienten-Thermocycler von VWR (Darmstadt).

Die Wahl der Primer richtet sich nach folgenden Gesichtspunkten: Komplementarität der Sequenz zum Ausgangsstrang (der Template-DNA); Schmelztemperatur; Nukleotid-Zusammensetzung bzw. -verteilung und Primer-Primer-Wechselwirkungen. Primer sollten möglichst keine stabilen Sekundärstrukturen oder Dimere bilden können, daher sind komplementäre Sequenzen innerhalb eines Primers bzw. zwischen den Primerpaaren zu vermeiden und die Schmelztemperaturen sollten möglichst identisch sein. Der GC-Gehalt sollte zwischen 40-60 % liegen. Am 3'-Ende der Primer ist darauf zu achten, dass nicht mehr als zwei Basen komplementär sind und keine Wiederholungen von drei oder mehr Guaninen bzw. Cytosinen vorliegen.

Soll eine gerichtete Klonierung erfolgen, enthalten die 5'Enden beider Primer integrierte Schnittstellen, welche das entstehende Produkt an beiden Seiten flankieren. Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Die in dieser Arbeit für DNA-Sequenzierung und für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 6-4 aufgelistet.

**Tabelle 6-4: PCR- und Sequenzier-Primer**

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)	
BLK-TK_F	AGAGGCTGACCCTGCCCTGTG	61,62	PCR+SEQ
BLK-TK_R	CTAGGGCTGCAGCTCGTACTG	61,43	PCR+SEQ
EBF1-12F	TGCGGATCTGGTAGAAGCACTGTATGG	63,74	PCR
EBF1-14F	GGCTCAGCTGCCAACTCCCCCTAT	63,93	PCR
EBF1-6F	AAGCTGTGGCAACCGAAATGAGACTC	62,51	PCR
ETV6-116f	CGATTCCGCCACTTCATGTTCCA	59,91	PCR
F-BCR-E1	TGAGGATTGCGGAGGCGGCTATACC	64,79	PCR
F-BLK-TK-2	ATTGAGCGCATGAATTCCATCCACC	60,69	SEQ
R-BLK-TK-2	TCACTGTCGATGATTCGAGCCAAG	61,03	SEQ
F-DDR1-2-TK	GATTTCCCTCGATCTCGACTCCG	60,3	SEQ
R-DDR1-2-TK	GAGTGCATCCTCTGCCAGGAAC	59,45	SEQ
F-DDR1-3-TK	GCTATCTGGCCACACTCAACTTTG	59,29	SEQ
R-DDR1-3-TK	GTTCCGGCTCATGCCAAAGTCTG	60,87	SEQ
F-EPHA7-2-TK	GAGCTGTCCATCAATTGCCAAG	59,91	SEQ

## MATERIAL & METHODEN

R-EPHA7-2-TK	CTACTACAAGTTCCCAGGGGAGTTTTTC	59,23	SEQ
F-EPHA7-3-TK	GCTGATATGGGATATGTTCACAGGG	58,04	SEQ
R-EPHA7-3-TK	GATCATCCTCTATAACTCGGGACAG	58,12	SEQ
F-EPHA7-E1	ATGGTTTTTCAAACCTCGGTACCCTTCATGGA	62,07	SEQ
F-EPHA7-E6	GTGAGTGGAGTAATGAAGGAGAGAGTACTGC	63,73	SEQ
R-EPHA7-E7	ACCTGTAGCTTCCTCTAGTGTAGCAACATC	63,58	SEQ
R-EPHA7-E12-13	CATGTTTCCTGAGAAATGCATCTAGGGCTC	63,98	SEQ
R-EPHA7-E17	CACACTTGAATGCCAGTTCATGTAAATGTAG	62,37	SEQ
F-EPHA7-FL-5UTR-1	GCTACTTCGGAACAAACAGCATTTAAAAATCCACGAC	65,63	LR-PCR
R-EPHA7-FL-5UTR-1	GCCAGTACTGTTCTCTTGCACTCTGTAATCTCC	65,79	LR-PCR
F-EPHA7-FL-5UTR-2	ACCGAGAAGGGGAATCGATGCAAGGAG	63,28	RT-PCR
R-EPHA7-FL-5UTR-2	TGGCACTTAGGAGTTCAAGTCTATAGGTGCTTC	63,83	RT-PCR
F-EPHA7-FL-5UTR-3	TGCGAGCGAACAGGAGTG	55,1	RT-PCR
R-EPHA7-FL-5UTR-3	CTTCTCTTCACTGTTGGAAGGAC	54,18	RT-PCR
F-EPHA7-E5	CTGACTTAAGCCGATCCCAGAGGCTC	64,37	PCR
R-EPHA7-E6_2	GATGACTCCATTGGGATGCTCTGGTTC	61,62	PCR
R-EPHA7-S altE	CACCTCACTTAGGTAGTCACATTATTTTCATTTCAGTG	63,5	PCR
F-ERBB4-1-RD	GTGGTAGATTCCAGTTCCTGTG	53,15	PCR
R-ERBB4-1-RD	CCTTGGGTGCAGTTTGGATG	54,97	PCR
F-ERBB4-2-RD	GTTCTTGTGTGCGTGCCTGC	58,41	SEQ
R-ERBB4-2-RD	TGGATGGCATGGGTGGCACT	58,12	SEQ
F-ERBB4-2-TK	GCTCAACTTCGTATTTTGAAAGAACTGAG	60,67	SEQ
R-ERBB4-2-TK	GTCTCGAGCCATCCTTGAAAACCTC	58,92	SEQ
F-ERBB4-3-RD	CAGTTCCAGTCCCTGAAGGAAATC	57,61	SEQ
R-ERBB4-3-RD	CCATCACTGGAACACAGATGGTTG	57,86	SEQ
F-ERBB4-E15	GGTCCTGACAACGTACAAAAGTGCTCTC	61,7	SEQ
R-ERBB4-E15	CACTCCCGATCTGGATCAGCATACTTG	63,07	SEQ
F-ERBB4-E22	ACCCATCAGAGTGACGTTTGGAGCTATG	63,34	SEQ
R-ERBB4-E28	TTCGGGATTATCCAATGCTTGAAGGTCTCC	63,31	SEQ
F-ERBB4-E16-JmA_2	CAAGGGTGTAACGGTCCCCTAGTCATG	62,29	PCR
F-ERBB4-E16-JmB	CATAGGCTCAAGTATTGAAGACTGCATCG	63,5	PCR
R-ERBB4-E17	GTCAGACCCACAATGACCAGAATGAAGAGC	63,63	PCR
F-ERBB4-E25	AGGCTTTCAACATCCCACCTCCCATCTATAC	63,58	PCR
R-ERBB4-E27	CAGGAGCTTCTGGAATTGTGCTAGTTGG	63,86	PCR
F-ETV6-N2	TATACACACACAGCCGGAGGTC	57,26	PCR
F-ETV6-N3	ATAATCACTGCCCAGCGTCCTC	59,05	PCR
F-FGFR1-2-TK	GCAGGGGTCTCTGAGTATGAGC	59,18	SEQ
R-FGFR1-2-TK	ATGGACAGGTCCAGGTACTCCTG	58,49	SEQ
F-FGFR2-2-IGLD	CTGACAAGGGAAATTATACCTGTG	54,61	SEQ
R-FGFR2-2-IGLD	GTGTCTGCCGTTGAAGAGAG	55,78	SEQ
F-FGFR2-2-TK	CCGAGTATGAACTTCCAGAGGACC	58,96	SEQ
R-FGFR2-2-TK	GTCCAAGTATTCCTCATTGGTTGTGAG	58,56	SEQ
F-FGFR2-3-IGLD	CCATCTCATCCGGAGATGATGAGG	60,18	PCR
R-FGFR2-3-IGLD	GCTTGCCCAGTGTGAGCTTATCTC	61,25	PCR

F-FGFR2-IGLD	GAAAGTGTGGTCCCATCTGAC	53,5	PCR
R-FGFR2-IGLD	CCATGACCACTTGCCCAAAG	54,97	PCR
F-FLT1-2-TK	AGTTTGCCCCGGGAGAGACTTAAAC	58,88	SEQ
R-FLT1-2-TK	CAAATCACCTAGTTTTTCCACAAGTTCTG	58,99	SEQ
F-FLT3-2-TK	GTATGAAAGCCAGCTACAGATGGTAC	58,87	SEQ
R-FLT3-2-TK	GCCAGCTGACATCCTAAAAACGAAG	60,38	SEQ
F-FLT3-3-TK	CAGCATGCCTGGTTCAAGAGAAG	60,16	SEQ
R-FLT3-3-TK	CCAGGTCTCTGTGAACACACGAC	58,76	SEQ
F-FLT3-ITD	CAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	53,51	PCR
R-FLT3-ITD	GTACCTTTCAGCATTTTGACG	52,78	PCR
F-FLT3-TK	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAG	53,51	PCR
R-FLT3-TK	CTGCATCTGCCAGCTGAC	56,02	PCR
F-FLT4-2-SHC	CTGAGAGACGGCACAAGGATGAG	61,03	SEQ
R-FLT4-2-SHC	CAACCAGATGAGTTCCCAGCCTG	59,89	SEQ
F-FLT4-2-TK	ATGCCAGCCAGTGGGAATTCCC	59,61	SEQ
R-FLT4-2-TK	ACCAGCAGTTCAGCATGATGCG	61,46	SEQ
F-FLT4-3-SHC	CGTGGTTCCTCCAGGATGAAGAC	58,74	SEQ
R-FLT4-3-SHC	TCTATCTGCTCAAACCTCCTCCGAG	60,43	SEQ
F-FLT4-E14	CTCACGCAGAACTTGACCGACCTC	62,22	SEQ
R-FLT4-E14	GCCTCTCGTCTTTGTACCACACGATG	62,32	SEQ
F-FLT4-E20	TCTGCAAGTACGGCAACCTCTCCAAC	63,04	SEQ
F-FLT4-E28	GACCCGTGGTTCCTCCAGGATGAAGAC	62,82	PCR
R-FLT4-E29	GCCTGCTCTCTATCTGCTCAAACCTCC	63,65	PCR
F-FLT4-E6	CTCTATGACATCCAGCTGTTGCCAG	63,24	SEQ
R-FLT4-E5	TGCTTGACCACTGGTGATACTGACAGC	63,05	PCR+SEQ
F-FLT4-I4-1	AAAGCCTCTTGCCAAGTGAATTCAAGGAG	63,69	PCR+SEQ
F-FLT4-I4-2	ATTGAGCCACTAGCTTAATGCCCCACAC	63,58	PCR+SEQ
F-FLT4-SHC	GATCAATGAGGAGTTCTGCCAG	56,48	PCR
R-FLT4-SHC	GTTCAACCAGATGAGTTCCCAG	54,99	PCR
F-FLT4-TK	CTACGATGCCAGCCAGTG	55,28	PCR
R-FLT4-TK	TCCGGACCAGCAGTTCAG	55,04	PCR
F-LCK-TK1	GACAACGGTGGCTTCTACATCTC	57,66	PCR+SEQ
R-LCK-TK1	TGAAGAAGTCCTCCAGCACACTG	59,38	PCR+SEQ
F-LCK-TK3	GGTACTACAACGGGCACACGAAGGTG	62,32	SEQ
R-LCK-TK2	CTGCCATGTCCAGGAGTTTGTGTTG	58,48	SEQ
F-NTRK3-2-TK	TTCCGTCAGGGACACAACCTGCC	59,33	PCR
R-NTRK3-2-TK	GAGGCAACAGAGTATGAATTCATGACC	59,2	PCR
F-NTRK3-3-TK	GCAATGATCCTTGTGGATGGACAG	58,48	SEQ
R-NTRK3-3-TK	CGAAGCTCCATACATCACTCTCTG	59,97	SEQ
R-NTRK3-E2	GCCGCACACTCCATAGAACTTG	58,73	PCR
R-NTRK3-E3	TGTAGTGGGTGGGCTTGTGTAAG	58,2	PCR
R-NTRK3-E4	TGCTCCGAAGTCCTGAGTTCTTG	60,06	PCR
F-PDGFRB-2-TK	TGCTTTGGCAGAAGAAGCCACG	61,49	PCR
R-PDGFRB-2-TK	AACAGTCTCTCGAGAAGCAGCAC	60,82	PCR

F-PDGFRB-3-TK	AGATCCGATGGAAGGTGATTGAGTC	59,09	SEQ
R-PDGFRB-3-TK	GGGCCGAATCTCAAACCTCTCTTC	58,84	SEQ
R-PDGFRB-E12	GCCACTTTTCATCGTGGCCTGAGAATGG	64,4	PCR
F-PDGFRB-TK	GAAGAAGCCACGTTACGAG	53,56	PCR
R-PDGFRB-TK	AAGCAGCACCAGCTGGGA	57,32	PCR
F-PTK7-2-TK	ATAAGATGCACTTCCCACGGTCTAG	59,72	PCR
R-PTK7-2-TK	TGCTGTCCACGGTGCTGTCTC	60,38	PCR
F-PTK7-3-TK	CATGTTCTACTGCAAGAAGCGCTG	62	PCR
F-PTK7-4-TK	AGAGATGGAATGCCTCAACGGTG	59,55	SEQ
F-PTK7-5-TK	GAGCCAGAGATGGAATGCCTCAAC	60,53	PCR
R-PTK7-6-TK	CTGTGAGCTTCCCTCTAGAGATGTC	60,69	PCR
F-PTK7-TK	ACGCTGGGGAAGAGTGAG	55,06	PCR
R-PTK7-TK	TTGCTGTCCACGGTGCTG	56,12	PCR
F-ROR1-2-TK:	CCTCTTTCTGCTGTACGCTTTATGG	60,67	SEQ
R-ROR1-2-TK	CCGAAGCCGGACGTGAATATCTT	60,12	SEQ
F-ROR1-3-TK	AAGATGGGACTGTGAAATCCAGCC	58,74	SEQ
R-ROR1-3-TK	ACTCTGGACCCTGTAGTAATCAGC	58,17	SEQ
F-ROR1-TK:	GCTACCTCTTTCTGCTGTAC	53,04	PCR
R-ROR1-TK	CCGAAGCCGGACGTGAAT	56,17	PCR
F-TEC-TK-1	AAGTGGAAGTGTGGAGTGGTGAG	58,31	PCR
F-Tyk2-E971fs	GAGATCTGCTTTGACGGAGAGGC	60,97	PCR
R-Tyk2-E971fs	CCAGACATCTGACGCATAGTAGAAC	59,14	PCR
TRKC-1947r	CCATAGAAGCTTGACAATGTGCTC	55,1	PCR
M13reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	45,94	SEQ

### 6.1.5 Long-Range PCR

Zur Amplifikation besonders große PCR-Produkte > 1,5 kb – 12 kb wurde das *Expand Long Template PCR System* von Roche (Mannheim) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Dieses System beinhaltet eine Taq-DNA-Polymerase und eine DNA-Polymerase mit *proofreading* Aktivität, welche eine um das dreifache verringerte Fehlerrate erreicht.

### 6.1.6 Elektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Elektrophorese bezeichnet die Auftrennung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Die Elektrophorese von DNA-Fragmenten erfolgt in Agarose-Gelen. Agarose dient als Matrix, in der die DNA-Moleküle aufgrund der negativen Phosphatgruppen von der Kathode zur Anode wandern. Dabei erlauben die unterschiedlichen Größen der DNA-Produkte eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit und kleine DNA-Moleküle wandern schneller als große. Zur Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente (< 1 kb) wurden höher prozentige Agarose-Gele verwendet werden (1,5 - 2 %), größere DNA-Fragmente (> 3 kb) wurden in 0,5 % Agarose-Gelen aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurde ein

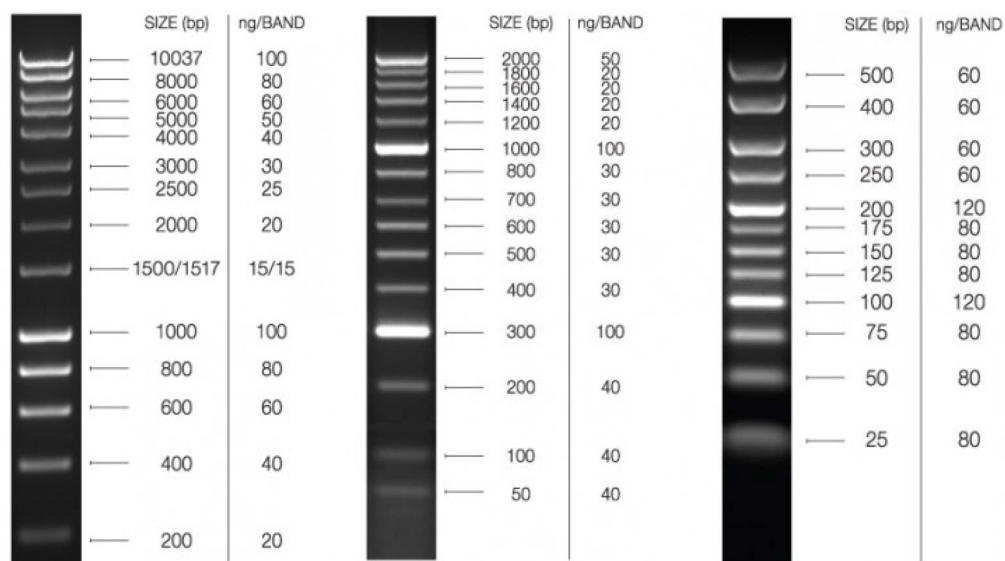


Größenstandard aufgetragen. Die Detektion der DNA erfolgte mit Hilfe des im Gel enthaltenen Ethidiumbromids, welches in die DNA interkaliert und unter UV-Licht ( $\lambda = 260\text{nm}$ ) fluoresziert.

### Durchführung:

Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethidiumbromid	10mg/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TAE - Puffer 25x	VWR, Darmstadt
TBE – Puffer 10x	VWR, Darmstadt
DNA-Probenpuffer (5x)	Bioline, Luckenwalde
DNA-Molekulargewichtsmarker 50 bp und 1 kb	Bioline, Luckenwalde

Zur Herstellung eines 1 %igen Agarose-Gels wurde 0,3 g Agarose in 300 ml 1 x TBE-Puffer gemischt und aufgekocht. Diese Lösung wurden mit 8  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem Größenstandard (siehe Abbildung 6-1) aufgetragen. Die Elektrophorese der DNA im auspolymerisierte Gel erfolgte in der Gelelektrophoresekammer befüllt mit 1 x TBE-Laufpuffer oder bei große DNA-Fragmente mit 1 x TAE-Puffer. Durch das Anlegen einer Spannung von 100-150 V erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente.



**Abbildung 6-1 | DNA-Größenstandards HyperLadder™ 1 kb, HyperLadder™ 50 bp und HyperLadder™ 25 bp (Quelle: Bioline, Luckenwalde)**

### 6.1.7 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Restriktionsenzyme gehören zu der Gruppe der Endonukleasen und spalten Doppelstrang-DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen. Restriktionsenzyme vom Typ II spalten DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, welche für das jeweilige Enzym charakteristisch sind.

**Durchführung:**

Restriktionspuffer	10x von NEB, Frankfurt
BSA	100x von NEB, Frankfurt
Restriktionsenzyme	10U/μl von NEB, Frankfurt

Der Restriktionsverdau wurde entsprechend der Herstellerangaben und der benötigten DNA-Menge angesetzt und für zwei Std. bei 37°C inkubiert. Nach dem Verdau und einer Auftrennung über Gelelektrophorese erfolgte die Aufreinigung geschnittener Fragmente über Gelextraktion oder mittels des „*PCR-Purification*“-Kits (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben.

**Tabelle 6-5: Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme**

Restriktionsenzym	Schnittstelle	Hersteller	Verwendung
BamHI	5' -G↓G A T C C-3'	NEB, Frankfurt	Klonierung EPHA7 in <i>pcDNA3.1</i>
XhoI	5' -C↓T C G A G-3'	NEB, Frankfurt	Klonierung EPHA7 in <i>pcDNA3.1</i>
EcoRI	5' -G↓A A T T C-3'	NEB, Frankfurt	Verdau pCR®2.1-TOPO®
KpnI	5' -G G T A C↓C-3'	NEB, Frankfurt	LDI PDGFRB
XmaI	5' - C↓C C G G G-3'	NEB, Frankfurt	LDI FGFR1
NsiI	5' - A T G C A↓T-3'	NEB, Frankfurt	LDI FGFR1
AvrII	5' - C↓C T A G G-3'	NEB, Frankfurt	LDI FGFR1

**6.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde mit Hilfe des „*GeneJET Gel Extraction*“-Kits der Firma Fermentas (ThermoFisher Scientific, Schwerte) gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt. Nach der Auftrennung im Agarose-Gel wurden die DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, die Gelstücke in Puffer gelöst und die DNA über Silicasäulen wiedergewonnen.

**6.1.9 Ligation**

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente sowie die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen Einzelstrangbrüchen. Hierbei werden sowohl kohäsive (*sticky ends*) als auch glatte Enden (*blunt ends*) miteinander verknüpft. Mit Hilfe der DNA-Ligation können durch PCR hergestellte und mittels Restriktionsenzyme verdaute DNA-Fragmente in entsprechend geschnittene Vektoren inseriert werden. Auch in der *Long-distance Inverse PCR* ist die Ligation ein entscheidender Schritt, der erlaubt lineare DNA zu zirkulären DNA-Molekülen zu verknüpfen.

**Durchführung**

T4 DNA-Ligase (5 U)	Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
10x Ligase-Puffer	Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)

**Ligation Vektor und Insert:**

Vektor	mit Restriktionsenzymen geschnitten und CIP behandelt
Linearisierte DNA zur Vektorintegration	mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten

**Long-distance Inverse PCR:**

Lineare genomische DNA	mit Restriktionsenzymen geschnitten
------------------------	-------------------------------------

Zur Herstellung von Expressionsvektoren erfolgte die Ligation eines PCR-Produktes mit dem dephosphorylierten Vektor. Das Mischverhältnis variierte je nach DNA-Menge und Länge des Inserts, es wurde jedoch immer ein Überschuss an Insert eingesetzt und das molare Verhältnis betrug etwa 1:5. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 16°C und 250 rpm im Thermomixer (Eppendorf GmbH, Wesseling).

**Tabelle 6-6: Pipettierschema Ligation Vektor und Insert**

Komponente	Volumen pro Reaktion [µl]
T4 DNA-Ligase 5 U	5
10 x Puffer	2
Vektor	variiert
linearisierte DNA	variiert
gesamt	20

Für die Religation genomischer DNA wurden 2 µg verdaute DNA in einem 50 µl Ansatz mit 5 µl DNA-Ligase 5 U eingesetzt.

**Tabelle 6-7: Pipettierschema Ligation genomischer DNA**

Komponente	Volumen pro Reaktion [µl]
T4 DNA-Ligase 5 U	5
10 x Puffer	5
2 µg genomische DNA	35
gesamt	50

**6.1.10 Langstrecken-inverse (LDI) PCR**

Mit der Langstrecken-inversen PCR (*Long Distance Inverse* (LDI) PCR) können unbekannte Translokationspartner identifiziert werden und der Bruchpunkt genau bestimmt werden. Zur Durchführung einer LDI-PCR wird nur die Sequenzinformation eines Partners benötigt. Zunächst wird die genomische DNA isoliert und diese mit Restriktionsenzymen, welche 3' eines potenziellen Bruchpunkts in 4 - 6 kb Entfernung im unveränderten 5'-Genbereich schneiden, verdaut. Die Restriktionsenzyme sollten überhängende Enden erzeugen, so dass eine anschließende Religation und Zirkularisierung der genomischen DNA erfolgen kann. Die Primer sind so lokalisiert, dass das Produkt der PCR der untranslozierten Sequenz zwischen 4 – 7 kb groß ist und der R-Primer in der Nähe der Restriktionsschnittstelle liegt. In parallelen Ansätzen können verschiedene Primer und Restriktionsenzyme verwendet werden. Liegt eine Translokation vor, wird zusätzlich zum PCR-Produkt des untranslozierten Gens ein zweites

PCR-Produkt abweichender Größe gebildet. Über Sequenzierung des PCR-Produkts kann der Bruchpunkt und Translokationspartner bestimmt werden.

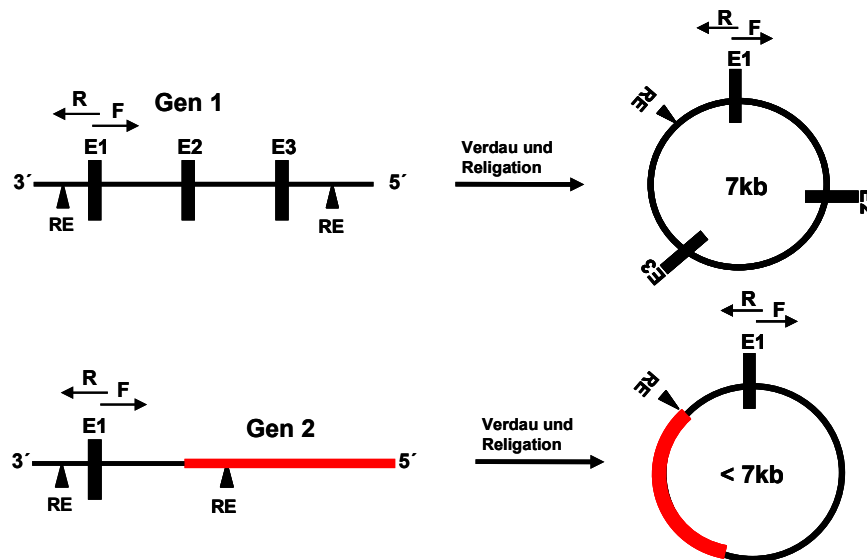


Abbildung 6-2: Schema einer LDI-PCR

### Durchführung

„Puregene“- Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	siehe Tabelle 6-5
MaXtract High Density	Qiagen, Hilden
Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol 100 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
3M NaAcetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glykogen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
T4 DNA-Ligase (5 U)	Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
10x Ligase-Puffer	Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)

Die mittels *Puregene* (Qiagen, Hilden) isolierte hochmolekulare DNA wurde mit passenden Restriktionsenzymen verdaut.

Tabelle 6-8: Pipettierschema Restriktionsverdau der genomischen DNA

Komponente	Volumen pro Reaktion [µl]
Restriktionsenzyme siehe Tabelle 6-5	variabel 10 - 20 U
2 µg genomische DNA	variabel
gesamt	50

Der Verdau inkubierte 24 Std. bei 37°C, anschließend wurde die DNA 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und mittels des „*MaXtract High Density*“-Kits aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Ethanol-Fällung der DNA (siehe Kapitel 6.1.1.4). In der darauffolgenden Ligation wurde die gesamte aufgereinigte DNA eingesetzt und mit 5 µl T4-Ligase und 5 µl Ligase Puffer über Nacht bei 16°C ligiert. Die Ligation wurde 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und mittels des *MaXtract High Density*-Kits und

anschließender EtOH-Fällung aufgereinigt. Zur Long-Distance PCR (siehe Kapitel 6.1.5) wurden 250 ng der geschnittenen, religierten und aufgereinigten DNA eingesetzt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte über Gelelektrophorese.

**Tabelle 6-9: Primer LDI-PCR**

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)	
pKpnI/f	CCTCAGCCACAGCCCGCAGCAGTGAGAAGC	72,61	LDI-PCR PDGFRB
pBr1	TCAGAGAGTCTTCCCACCCAAGTTGAGTCC	64,47	LDI-PCR PDGFRB
R-FGFR1-E9	AGCCGTGATGGCCGAACCAAGAAGC	64,67	LDI-PCR FGFR1
F-FGFR1-E12	CCTTGATGTCATCGTGGAGTATGCCTCC	63,37	LDI-PCR FGFR1
F-FGFR1-I12	CAGCCCCATGTGGACTTGCTGTGC	63,83	LDI-PCR FGFR1
F-FGFR1-E11	GGACGCAACAGAGAAAGACTTGTCAGACC	63,87	LDI-PCR FGFR1

### 6.1.11 Reverse Transkription - cDNA Synthese

Die reverse Transkription (RT) mittels des retroviralen Enzyms reverse Transkriptase ermöglicht die Synthese einer zur mRNA komplementäre DNA (cDNA). Diese Umschreibung von RNA in cDNA ermöglicht somit die Synthese vollständig prozessierter Gene aus der mRNA, die Bestimmung der vorkommenden Transkript- und Spleißvarianten und eine Quantifizierung des RNA-Expressionslevels eines Gens (qPCR).

Die reverse Transkription kann mittels Oligo-dT Primern erfolgen, welche an die Poly-A Schwänze prozessierter mRNA binden, mittels random Primer, welche unselektiv die gesamte RNA in cDNA umschreiben oder genspezifischer Primer (GSP), welche die cDNA-Synthese eines spezifischen Zielgens ermöglichen.

#### 6.1.11.1 Reverse Transkription für den „*TaqMan low density Array*“

Die cDNA wurde unter Verwendung von random Primern aus Gesamt-RNA Proben mittels des „*High Capacity cDNA Archive*“-Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) gemäß den Herstellerangaben generiert. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

#### 6.1.11.2 Reverse Transkription mittels *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*

Zur cDNA-Synthese für nachfolgende PCRs, wurde die *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* von Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte) eingesetzt.

**Tabelle 6-10: Pipettierschema reverse Transkription**

Komponente	Volumen pro Reaktion [µl]
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
10x RT Buffer	2
Oligo dT oder Random Primer 10x	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
RNA 2000 ng	variabel
H <sub>2</sub> O	ad 20

**Tabelle 6-11: Reaktionsbedingungen reverse Transkription**

Programmschritt	Dauer	Temperatur [°C]
reverse Transkription	120 min	37
Deaktivierung	5 min	85

#### 6.1.11.3 „*Transcriptor first strand synthesis*“-Kit von Roche

Zur Synthese langer cDNA Sequenzen wurde das „*Transcriptor first strand synthesis*“-Kit von Roche (Mannheim) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

Dazu wurde im ersten Schritt 1 µg RNA mit Oligo-dT Primern gemischt und für 10 min bei 65°C denaturiert, im zweiten Schritt erfolgte die reverse Transkription. Bei einer Größe der Zieltranskripte < 4 kb erfolgte die Umschreibung bei 55°C für 30 min, Transkripte > 4 kb wurden bei 50°C für eine Std. inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

#### 6.1.12 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR), auch Real-Time PCR genannt, erlaubt eine Quantifizierung der eingesetzten DNA-Menge direkt während deren Vervielfältigung. Mittels der RT-qPCR kann die mRNA-Menge transkribierter Gene bestimmt werden.

Am Ende eines jeden PCR-Zyklus wird die cDNA-Menge mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen gemessen. Dabei können unspezifische Farbstoffe, welche sich an DNA anlagern (z.B. SYBR-Green), eingesetzt werden oder die Quantifizierung erfolgt über spezifische Sonden. Diese sind komplementär zur amplifizierten Sequenz und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. TaqMan-Sonden sind an einem Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FAM, JOE, HEX) und am anderen Ende mit einem Quencher (z.B. BHQ1) markiert. Bei der Verwendung dieser Sonden wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) ausgenutzt, bei dem ein angeregtes Donor-Fluorochrom (Reporterfarbstoff) einen Teil der Energie an ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) abgibt. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, kann kein FRET mehr erfolgen und das Fluoreszenzsignal des Donors nimmt zu. Durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase wird die angelagerte Sonde während Synthese des Gegenstranges abgebaut und die räumliche Entfernung zwischen Reporter und Quencher nimmt zu.

Unspezifische Fluoreszenzfarbstoffe hingegen detektieren sämtliche dsDNA, auch unspezifische Nebenprodukte oder Primerdimere. Um deren Einfluss auf die gemessene Fluoreszenz auszuschließen, erfolgte im Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse. Die Fluoreszenz der die DNA unspezifischen bindenden Farbstoffe verhält sich proportional zur Menge der PCR-Produkte. Die Quantifizierung erfolgt innerhalb der exponentiellen Phase.

Als passive Referenz ist den q-PCR Mastermixen zur Normalisierung des Reportersignales der Farbstoff ROX zugesetzt. Dessen Fluoreszenz bleibt während der PCR-Reaktion konstant und dient als interne Referenz. Dadurch werden Pipettierfehler oder

Konzentrationsunterschiede ausgeglichen. Aus dem Quotienten der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes und der passiven Referenz errechnet sich der Rn-Wert (normalisierter Reporter). Für die weitere Analyse der quantitativen PCR wird der  $\Delta Rn$ -Wert, welcher der Differenz des Rn-Wertes der Kontrollreaktion ohne Template-DNA und des Rn-Wertes der untersuchten Probe entspricht, gegen die Zykluszahl aufgetragen. Aus den derart dargestellten Ergebnissen wird der Ct-Wert (*Cycle Threshold*, Ct) bestimmt. Dieser gibt den PCR-Zyklus wieder, an dem die exponentielle und quantifizierbare Phase über den Hintergrundwert ansteigt. Der Ct-Wert verhält sich indirekt proportional zu der in der untersuchten Probe ursprünglich enthaltenen Menge an Template-DNA.

Eine relative Quantifizierung erfolgte über die Verwendung eines Referenzgens, auch Haushaltsgen (engl.: *housekeeping gene*) genannt. Dies sind konstitutiv exprimierte Gene, welche idealerweise konstant und unabhängig von Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden und so eine Normierung der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA ermöglichen.

Bei dem Design einer qPCR ist darauf zu achten, dass die PCR-Effizienz umso höher ist, je kleiner das Amplikon ist. Die Amplikon Länge liegt idealerweise zwischen 75-150 bp und sollte möglichst viele Transkriptvarianten abdecken. Die Primer sollten so gewählt werden, dass diese in verschiedenen Exons liegen oder exonübergreifend sind, wodurch verhindert wird, dass genomische DNA amplifiziert werden kann. Des Weiteren sollte die Entstehung von Primerdimeren vermieden werden und ein möglichst konstanter Schmelzpunkt erreicht werden. Die Sonden sind am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher markiert, der SMP sollte mindesten 5°C unterhalb des SMP der Primer liegen und die Entstehung von Sekundärstrukturen vermieden werden. In einem Ansatz können mehrere Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt werden. Für jede qPCR ist der Schmelzpunkt ( $T_M$ ), die ideale Primer- und Sonden- und  $MgCl_2$ -Konzentration empirisch zu bestimmen. Als Richtwerte für die Primer- und Sondenkonzentrationen dienen Konzentrationen von 0,2-0,5  $\mu M$ .

#### **6.1.12.1 Quantitative PCR mittels „*ROTOR Gene Multiplex RT-Mastermix*“**

Der „*Rotor-Gene Multiplex RT-Mastermix*“ (Qiagen, Hilden) erlaubt die reverse Transkription und qPCR mehrerer Gene innerhalb eines Reaktionsgefäßes. Die quantitative PCR erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Ausgewählt wurden der  $T_M$ -Wert und die Konzentrationskombinationen, welche den niedrigste Ct-Wert und den höchste  $\Delta Rn$ -Wert erreichen. Die Konzentrationen der Primer lagen zwischen 0,3  $\mu M$  – 0,9  $\mu M$ , die der Sonde zwischen 0,1  $\mu M$  – 0,4  $\mu M$ . Es wurden jeweils 100 ng RNA eingesetzt.

**Tabelle 6-12: qPCR-Programm**

Programmschritt	Dauer	Temperatur [°C]	
reverse Transkription	15 min	50	1 Zyklus
Inaktivierung RT, Aktivierung Polymerase	5 min	95	1 Zyklus
Denaturierung	15 sec	94	40-45 Zyklen
Annealing und Elongation	15 sec	60	

**Tabelle 6-13: qPCR-Primer und Sonden**

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)	
F-EPHA7-E3	GTATCTGCAAAGCAGGCTACCAGC	61,8	qPCR
R-EPHA7-E4	GAGTTGGACAACGAGAGCACTGAAG	61,2	qPCR
R-EPHA7-TAQ	FAM-TGAGAGGAAGACTTGTAGAACCCACGGCCACAG-BHQ1	65,7	Sonde
F-ERBB4-E4	TGCAGACACCATTTCATTGGCAAG	56,82	qPCR
R-ERBB4-E5-6	CACACCGTCCTTGTCAAAGTCTG	56,27	qPCR
ERBB4-E5-TAQ	FAM-TGTTTCGGAACCCATGGCCTTCCAATTGAC-BHQ1	62,54	Sonde
F-FLT4-E25	CCTGAAGTGGATGGCCCCCTGAA	57,54	qPCR
R-FLT4-E26	GCAGAACTCCTCATTGATCTGCACC	59,26	qPCR
F-FLT4-E25 TAQ	FAM-CATCTTCGACAAGGTGTACACCACGCAGAGTGAC-BHQ1	65,56	Sonde
F-NTRK3-E11	GATCAACAAATATGGTCGACGGTCC	56,21	qPCR
R-NTRK3-E12	GCGAGTCATGCCAATGACCAC	55,81	qPCR
NTRK3-E12-TAQ	FAM-TTGGGAATGAAGGGTCCCGTGGCTGTCATC-BHQ1	62,43	Sonde
HCK-F	TATTAGCACCATCCATAGGAGGCTT	57,1	qPCR
HCK-R	GTTAGGGAAAGTGGAGCGGAAG	55,74	qPCR
HCK-SONDE	HEX-TAACGCGTCCACCAAGGATGCGAA-BHQ1	59,98	Sonde
F-EPHA3-E13-CNV	TGCCCAGTTTACTGTTCATTACAGCTAG	60,85	CNV
R-EPHA3-E13-CNV	GTGAACATAGCCCATGTCTGACAGG	59,73	CNV
EPHA3-E13-TAQ	FAM-CTTCATGCCAGATGCTATCCCTCGAAGC-BHQ	65,95	Sonde

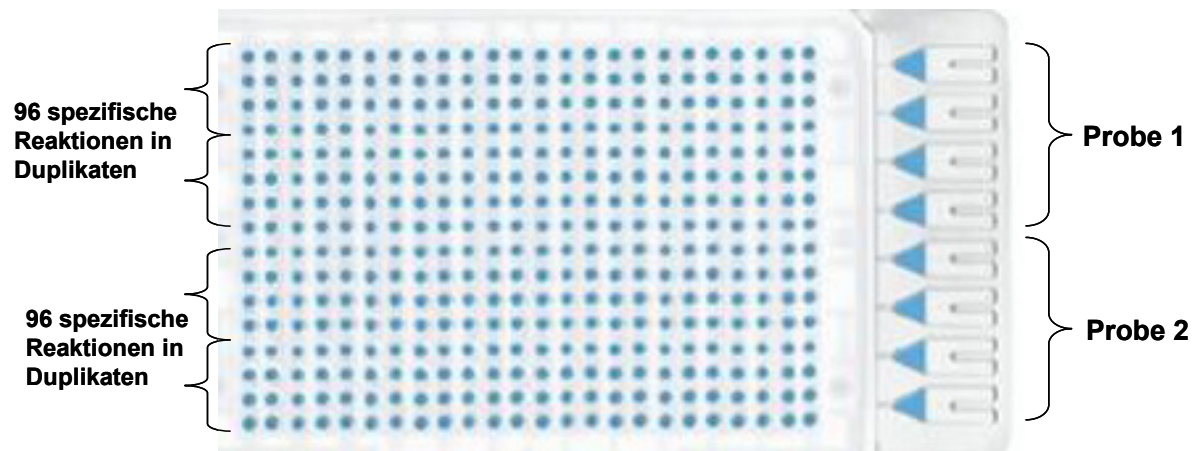
### 6.1.13 Expressionsanalyse mittels *TaqMan® Array Card*

Die „*TaqMan® Array Card*“ von Applied Biosystems (Life Technologies, Darmstadt) ermöglicht die simultane Analyse von 384 qPCRs in den 384 Mikroreaktionsräumen einer Platte. Jeder dieser Reaktionsräume ist mit Gen-spezifischen Primerpaaren und TaqMan-Sonden beschichtet. In der hier verwendeten „*TaqMan® Array Card*“ waren 96 unterschiedliche Primer/Sonden-Kombinationen in je vierfacher Ausführung aufgetragen. Dies ermöglichte pro Array die Untersuchung von zwei Patientenproben als Doppelbestimmung. Die cDNA-Menge wurde über Fluoreszenzmessungen der TaqMan-Sonden bestimmt.

Die RNA wurde mittels TRIzol® aus Knochenmarkproben isoliert und die reverse Transkription erfolgte mit dem „*High Capacity cDNA Archive*“-Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Die cDNA wurde dem *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Darmstadt), welcher die *AmpliTaQ Gold®* DNA Polymerase mit Nukleaseaktivität, *AmpErase*, eine passive Referenz, Nukleotide und optimierte Pufferbedingungen enthält,



hinzugefügt. Die qPCR erfolgte im 7900HT FastReal Time PCR System von Applied Biosystem.



**Abbildung 6-3: Custom TaqMan® Array Card**

Abbildung modifiziert nach *TaqMan® Array Card Assay Handbook*, Applied Biosystems, Darmstadt.

#### Durchführung:

Aus 4000 ng RNA wurde die cDNA synthetisiert und diese mit H<sub>2</sub>O auf eine Menge von 200 µl eingestellt. Die cDNA wurde dem 2x *TaqMan® Universal PCR Master Mix* zugegeben, gemischt und je 100 µl davon in die Reservoirs der „*TaqMan® Array Card*“ aufgetragen. Die Platte wurde anschließend zweimal je eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert und die Reaktionsräume anschließend versiegelt. Die qPCR erfolgte im 7900HT FastReal Time PCR Systems von Applied Biosystem (Life Technologies, Darmstadt).

**Tabelle 6-14: qPCR-Programm der „TaqMan® Array Card“**

Programmschritt	Dauer	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	10 min	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	30 s	95°C	3 Zyklen
Annealing und Elongation	1 min	60°C	
Denaturierung	15 s	97°C	
Annealing und Elongation	1 min *	72°C	40 Zyklen

\* Detektion der TaqMan-Fluoreszenz

#### Auswertung der qPCR-Daten:

Die Ct-Werte wurden über Definition eines Schwellenwertes im Analyseprogramm „*SDS-RQ Manager*“ (Applied Biosystems) erhalten. Je höher ein Ct-Wert ist, desto geringer ist die Ausgangsmenge an mRNA. Ein Ct-Wert von 40, die maximale Zykluszahl, entspricht dem eines nicht exprimierten Gens. Die Ct-Daten wurden anschließend mittels der DDC<sub>T</sub>-Methode ausgewertet (siehe Kapitel 6.4.1).

**Tabelle 6-15: Mittels „TaqMan® Array Card“ untersuchte Gene und Lage der Primer**

RTK: Rezeptor Tyrosinkinasen, NRTK: Zytoplasmatische Tyrosinkinasen, S/T-K: Serin-Threonin Kinasen.  
Exonnummerierung laut RefSeq

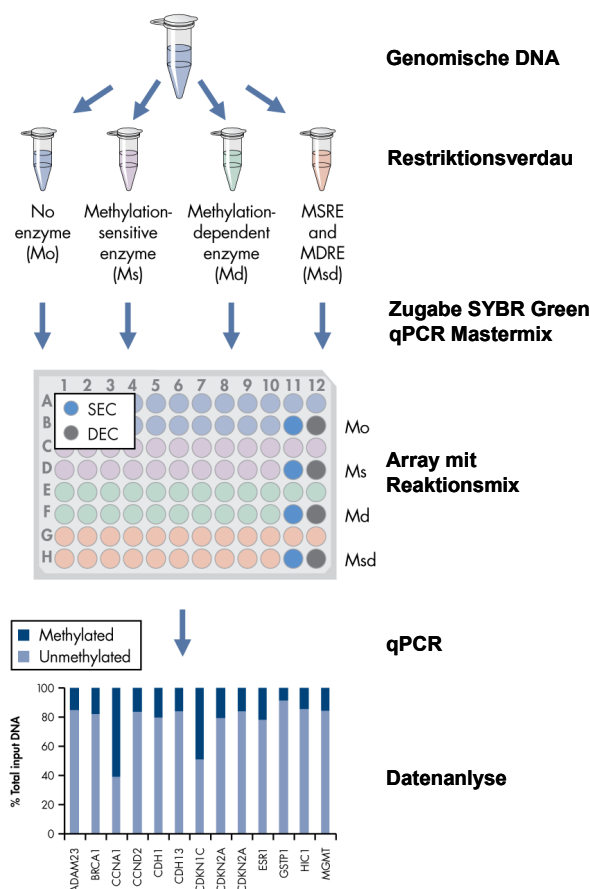
Gen		Assay ID Applied Biosystems	Primer 1	Primer 2	Amplikonlänge
AATK, Variante 1	S/T-K	Hs00185425_m1	Exon 7	Exon 8	61 Nt
ABL1, Variante a	NRTK	Hs01104721_m1	Exon 10	Exon 11	74 Nt
ABL2	NRTK	Hs00270858_m1	Exon 1	Exon 2	61 Nt
ALK	RTK	Hs00608289_m1	Exon 23	Exon 24	71 Nt
AXL, Variante 1	RTK	Hs01064444_m1	Exon 19	Exon 20	52 Nt
B2M	Kontrolle	Hs99999907_m1	Exon 2	Exon 3	75 Nt
BLK	NRTK	Hs01017452_m1	Exon 10	Exon 11	73 Nt
BMX	NRTK	Hs00176455_m1	Exon 12	Exon 13	93 Nt
BTK	NRTK	Hs00975865_m1	Exon 4	Exon 5	125 Nt
CSF1R	RTK	Hs00234622_m1	Exon 2	Exon 3	114 Nt
CSK	NRTK	Hs00177843_m1	Exon 1	Exon 2	107 Nt
DDR1, Variante 1	RTK	Hs00233612_m1	Exon 8	Exon 9	80 Nt
DDR2	RTK	Hs00178815_m1	Exon 1	Exon 2	93 Nt
EGFR	RTK	Hs01076092_m1	Exon 7	Exon 8	103 Nt
EPHA1	RTK	Hs00178313_m1	Exon 2	Exon 3	66 Nt
EPHA2	RTK	Hs00171656_m1	Exon 16	Exon 17	55 Nt
EPHA3	RTK	Hs00739096_m1	Exon 7	Exon 8	101 Nt
EPHA4	RTK	Hs00177874_m1	Exon 2	Exon 3	91 Nt
EPHA5	RTK	Hs00300724_m1	Exon 4	Exon 5	72 Nt
EPHA6, Variante 1	RTK	Hs00297133_m1	Exon 11	Exon 12	95 Nt
EPHA7	RTK	Hs00177891_m1	Exon 3	Exon 4	88 Nt
EPHA8	RTK	Hs00184126_m1	Exon 5	Exon 6	71 Nt
EPHB1	RTK	Hs01057854_m1	Exon 7	Exon 8	62 Nt
EPHB2	RTK	Hs01031827_m1	Exon 14	Exon 15	99 Nt
EPHB3	RTK	Hs01082568_g1	Exon 5	Exon 6	72 Nt
EPHB4	RTK	Hs01119118_g1	Exon 5	Exon 6	80 Nt
EPHB6	RTK	Hs00270052_m1	Exon 1	Exon 2	68 Nt
ERBB2, Variante 2	RTK	Hs01001580_m1	Exon 17	Exon 18	60 Nt
ERBB3	RTK	Hs00951455_m1	Exon 26	Exon 27	66 Nt
ERBB4	RTK	Hs00171783_m1	Exon 10	Exon 11	77 Nt
FER	NRTK	Hs00245497_m1	Exon 11	Exon 12	100 Nt
FES, Variante 1	NRTK	Hs00171375_m1	Exon 5	Exon 6	69 Nt
FGFR1, Variante 1	RTK	Hs00241111_m1	Exon 5	Exon 6	81 Nt
FGFR2, Variante 1	RTK	Hs01552926_m1	Exon 5	Exon 6	77 Nt
FGFR3, Variante 1	RTK	Hs00997393_g1	Exon 17	Exon 18	139 Nt
FGFR4	RTK	Hs00242558_m1	Exon 8	Exon 9	74 Nt
FGR	NRTK	HS00178340_m1	Exon 5	Exon 6	61 Nt
FLT1_49	RTK	Hs01052949_g1	Exon 23	Exon 24	116 Nt
FLT1_61	RTK	HS01052961_m1	Exon 8	Exon 9	72 Nt
FLT3	RTK	Hs00975659_m1	Exon 4	Exon 5	137 Nt

<i>FLT4</i>	RTK	Hs01047677_m1	Exon 27	Exon 28	111 Nt
<i>FRK</i>	NRTK	Hs00176619_m1	Exon 1	Exon 2	68 Nt
<i>FYN</i> , Variante 1	NRTK	Hs00176628_m1	Exon 5	Exon 6	99 Nt
<i>GAPDH</i>	Kontrolle	Hs99999905_m1	Exon 3	Exon 3	122 Nt
<i>GUSB</i>	Kontrolle	Hs99999908_m1	Exon 11	Exon 12	81 Nt
<i>HCK</i> , Variante 1	NRTK	Hs00176654_m1	Exon 6	Exon 7	64 Nt
<i>IGF1R</i>	RTK	Hs00609566_m1	Exon 10	Exon 11	64 Nt
<i>INSR</i>	RTK	Hs00961560_m1	Exon 8	Exon 9	91 Nt
<i>INSRR</i>	RTK	Hs00299816_m1	Exon 7	Exon 8	58 Nt
<i>ITK</i>	NRTK	Hs00950634_m1	Exon 16	Exon 17	80 Nt
<i>JAK1</i>	NRTK	Hs00233820_m1	Exon 11	Exon 12	84 Nt
<i>JAK2</i>	NRTK	Hs01078124_m1	Exon 19	Exon 20	94 Nt
<i>JAK3</i>	NRTK	Hs00169663_m1	Exon 23	Exon 24	95 Nt
<i>KDR</i>	RTK	Hs00911705_g1	Exon 4	Exon 5	84 Nt
<i>KIT</i>	RTK	Hs00174029_m1	Exon 1	Exon 2	64 Nt
<i>LCK</i>	NRTK	Hs00178427_m1	Exon 9	Exon 10	104 Nt
<i>LMTK2</i>	S/T K	Hs00905745_m1	Exon 9	Exon 10	100 Nt
<i>LTK</i> , Variante 1	RTK	Hs01587782_g1	Exon 19	Exon 20	134 Nt
<i>LYN</i>	NRTK	Hs00176719_m1	Exon 12	Exon 13	70 Nt
<i>MATK</i>	RTK	Hs00176738_m1	Exon 8	Exon 9	75 Nt
<i>MERTK</i>	RTK	Hs00179024_m1	Exon 4	Exon 5	110 Nt
<i>MET</i>	RTK	Hs01565575_m1	Exon 14	Exon 15	115 Nt
<i>MST1R</i>	RTK	Hs00234013_m1	Exon 1	Exon 2	94 Nt
<i>MUSK</i>	RTK	Hs00171797_m1	Exon 9	Exon 10	109 Nt
<i>NTRK1</i> , Variante 2	RTK	Hs01021011_m1	Exon 16	Exon 17	62 Nt
<i>NTRK2</i> , Variante a	RTK	Hs00178811_m1	Exon 8	Exon 9	57 Nt
<i>NTRK3</i> , Variante 1	RTK	Hs00176797_m1	Exon 13	Exon 13	67 Nt
<i>PDGFRA</i>	RTK	Hs00998018_m1	Exon 15	Exon 16	84 Nt
<i>PDGFRB</i>	RTK	Hs00182163_m1	Exon 1	Exon 2	86 Nt
<i>PTK2</i>	NRTK	Hs00178587_m1	Exon 22	Exon 23	68 Nt
<i>PTK2B</i> , Variante 1	NRTK	Hs00169444_m1	Exon 35	Exon 36	65 Nt
<i>PTK6</i>	NRTK	Hs00178742_m1	Exon 1	Exon 2	86 Nt
<i>PTK7</i> , <i>PTK7-1</i>	RTK	Hs00177173_m1	Exon 17	Exon 18	59 Nt
<i>RET</i>	RTK	Hs01120032_m1	Exon 7	Exon 8	90 Nt
<i>ROR1</i>	RTK	Hs00938677_m1	Exon 4	Exon 5	107 Nt
<i>ROR2</i>	RTK	Hs00171695_m1	Exon 5	Exon 6	76 Nt
<i>ROS1</i>	RTK	Hs00177228_m1	Exon 21	Exon 22	68 Nt
<i>RYK</i>	RTK	Hs00243196_m1	Exon 10	Exon 11	84 Nt
<i>SRC</i>	NRTK	Hs00178494_m1	Exon 7	Exon 8	70 Nt
<i>SRMS</i>	NRTK	Hs00365564_m1	Exon 1	Exon 2	69 Nt
<i>SYK</i>	NRTK	Hs00177369_m1	Exon 6	Exon 7	93 Nt
<i>TEC</i>	NRTK	Hs00177389_m1	Exon 11	Exon 12	95 Nt
<i>TEK</i>	RTK	Hs00945155_m1	Exon 9	Exon 10	77 Nt
<i>TIE1</i>	RTK	Hs00178500_m1	Exon 1	Exon 2	74 Nt

<i>TNK1</i>	NRTK	Hs00177708_m1	Exon 10	Exon 11	73 Nt
<i>TNK2</i>	NRTK	Hs00416477_m1	Exon 4	Exon 5	95 Nt
<i>TXK</i>	NRTK	Hs00177433_m1	Exon 11	Exon 12	113 Nt
<i>TYK2</i>	NRTK	Hs00177464_m1	Exon 9	Exon 10	80 Nt
<i>TYRO3</i>	RTK	Hs00170723_m1	Exon 18	Exon 19	62 Nt
<i>YES1</i>	NRTK	Hs00736972_m1	Exon 2	Exon 3	153 Nt
<i>ZAP70</i> , Variante 1	NRTK	Hs00896347_m1	Exon 13	Exon 14	75 Nt

#### 6.1.14 Methylierungsanalyse mittels *EpiTect® Methyl qPCR Array*

Der „*EpiTect® Methyl qPCR Array*“ von SABBioScience (Qiagen, Hilden) nutzt zur Methylierungsanalyse Restriktionsenzyme. Es werden methylierungssensitive Restriktionsenzyme (Ms), welche nur unmethylierte DNA schneiden und/oder Methylierungsabhängige Restriktionsenzyme (Md), welche ausschließlich methylierte DNA verdauen, eingesetzt. Anschließend wird die geschnittene DNA über qPCR quantifiziert. Dabei werden Primer verwendet, welche die Promotorregion des Zielgens flankieren. Der relative Anteil an hypermethylierter, intermediär und unmethylierter DNA werden über den Vergleich der quantitativen DNA-Analyse zwischen den verschiedenen Restriktionsansätzen gegenüber der unbehandelten DNA ( $M_0$ ) bestimmt.



**Abbildung 6-4 Schematischer Versuchsaufbau des „*EpiTect® Methyl qPCR Arrays*“**  
Abbildung modifiziert nach *EpiTect® Methyl qPCR Assay Handbook*, Qiagen, Hilden.

**Tabelle 6-16: Mit dem „EpiTect® Methyl qPCR Array“ analysierte Gene**

Gen	UniGene #	RefSeq #	Cat #
NTRK3	Hs.410969	NM_001012338.2	MePH19717-3A
EPHA7	Hs.73962	NM_004440	MePH09275-1A
ERBB4	Hs.390729	NM_005235	MePH04145-3A
PTK7	Hs.90572	NM_002821.4	MePH09007-1A
ABL1	Hs.431048	NM_007313	MePH13117-1A
ABL1	Hs.431048	NM_005157	MePH13120-2A
DDR1	Hs.631988	NM_001954.4	MePH08729-1A
FLT1	Hs.654360	NM_002019	MePH17614-2A
FLT3	Hs.507590	NM_004119	MePH17612-1A
FGFR1	Hs.264887	NM_023110.2	MePH11414-3A
FLT4	Hs.646917	NM_182925.4	MePH08374-2A
HCK	Hs.655210	NM_002110	MePH25702-1A

**Durchführung:**

Es wurde der Methylierungszustand von zwölf Promotor-Abschnitten untersucht. Pro Restriktionsansatz wurde 250 ng genomische DNA eingesetzt, der Restriktionsverdau (37°C, 6 Std.) und die qPCR erfolgten gemäß den Herstellerangaben. Zu den mit Primern beschichteten Reaktionsräumen der „EpiTect Methyl qPCR“ 96-well Platte wurden je 25 µl der geschnittene genomische DNA im SYBR-Green-Mastermix zugegeben. Anschließend wurde die Platte versiegeln. Die qPCR erfolgte im 7900HT FastReal Time PCR Systems von Applied Biosystem (Life Technologies, Darmstadt).

**Tabelle 6-17 PCR-Programm „EpiTect® Methyl qPCR Array“**

Programmschritt	Dauer	Temperatur [°C]	
Denaturierung	10 min	95	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec	99	3 Zyklen
Annealing und Elongation	1 min	72	
Denaturierung	15 sec	97	40 Zyklen
Annealing und Elongation	1 min *	72	
		Schmelzkurve	

\* Detektion der SYBR® Green-Fluoreszenz

**6.1.15 5'- Rapid Amplification of cDNA Ends**

Die „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE) ist eine Technik um die Sequenz der cDNA-Enden mitsamt der 5'- oder 3'- UTR eines RNA-Transkriptes zu erhalten. Diese Methode kann auch zur Identifizierung von Fusionsgenen dienen.

In dieser Arbeit wurde das „GeneRacer® Kit with SuperScript® III RT and TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing“ von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Im ersten Schritt entfernt ein spezifisches Enzym die mRNA-CAP-Struktur und ein RNA-Oligo (Anker) wird an das frei gewordenen 5'-P-Ende der mRNA ligiert. Die reverse Transkription der mRNA erfolgte

mittels SuperScriptIII, die PCR der cDNA mit genspezifischen Primern (GSP) und Ankerprimern. Eine anschließende nested PCR amplifizierte das Zielgen nochmals.

**Tabelle 6-18. 5'RACE-Primer**

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)	
R-PDGFRB_1 = SP1	GAAGGTGTGTTTGTTCGG	52,82	5'RACE
R-PDGFRB_2 = SP2	TTGACGGCCACTTTCATCG	54,89	5'RACE
R-PDGFRB_3 = SP3	TGGCTTCTTCTGCCAAAGC	55,62	5'RACE
R-NTRK3-R1	TCCGGGCAGCCAGGGTGGGATCCTTCAG	68,72	5'RACE
R-NTRK3-R2	AGGCTCCCTCACCCAGTCTCGCTTCAG	67,77	5'RACE
R-NTRK3-R3	AGCTCGGCCTCCCTCTGGAAATC	62,65	5'RACE
R-NTRK3-R4	ACGGAAGTACTGGGGGTTCTCAATG	59,81	5'RACE
R-ABL-E3-R1	TGCTTGGGACCCAGCCTTGGCCATTT	65,06	5'RACE
R-ABL-E3-R2	GTGATTATAGCCTAAGACCCGGAGCTTT	62,05	5'RACE

### 6.1.16 High Resolution Melt (HRM) Analyse

Die *High Resolution Melt* (HRM) Analyse erlaubt mit relativ geringen Aufwand und kosteneffizient Mutationen und *Single Nucleotide Polymorphismen* (SNPs) zu detektieren. Durch PCR wird der Sequenzabschnitt, in welchem die Mutation lokalisiert ist, amplifiziert und dieser Abschnitt über eine Schmelzkurvenanalyse untersucht. Dazu wird die amplifizierte DNA in Anwesenheit von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen, beispielsweise SYBR-Green, von ca. 50°C auf 95°C in 0,1°C Schritten erhitzt und die Fluoreszenz gemessen. Am Schmelzpunkt des DNA-Fragments teilt sich die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge, wodurch der interkalierende Farbstoff nicht mehr an die DNA binden kann und die Fluoreszenz stark reduziert wird. Die Schmelztemperatur (T<sub>M</sub>) ist von der DNA-Sequenz abhängig und schon der Austausch einer Base führt zu einem veränderten T<sub>M</sub>-Wert. Der Unterschied beträgt meist nur den Bruchteil eines Grades, dies kann aber z.B. mit einem Real Time Cycler detektiert werden. Mit dieser Methode kann die Wildtypform von einer heterozygoten oder homozygoten vorliegenden Mutation unterschieden werden, da jede dieser Varianten eine typische Schmelzkurve aufweist. Die Amplikon-Größe sollte 70 bp – 250 bp betragen, je kleiner das Amplikon ist, desto besser lassen sich einzelne Nukleotidveränderungen detektieren.

In dieser Arbeit wurde der „*Type-it® HRM™ PCR*“-Mastermix von Qiagen verwendet, die Messung der Schmelzkurven erfolgte mittels des Rotor Gene Cyclers (Qiagen, Hilden).

**Tabelle 6-19: HRM-Primer**

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)	
F-FLT4-4-SHC	CTGTAAAGGACCTGGCCAGAATG	58,12	HRM
R-FLT4-4-SHC	CCATACTCGCTGTTGTAAAACACC	56,8	HRM
F-FLT4-TK-I18	TGTGAGGCCCGTGTCCCCTCCAGA	64,35	HRM
R-FLT4-TK-E19	TGCCGATGTGAATGAGGATCTTGAGCTC	64,64	HRM

F-ROR1-3-TK	TATCTCCCAGGCATGGACCATG	57,72	HRM
R-ROR1-3-TK	GCACCTAGAAGGCAGACAATATTG	57,69	HRM
F-ROR1-4-TK	CTCAGGAACAACCTGTGTGCATG	58,56	HRM

**Tabelle 6-20: Pipettierschema einer HRM-PCR**

Komponente	Menge [ $\mu$ l]
2 x HRM-PCR Master Mix	12,5
10 $\mu$ M Primermix (10 $\mu$ M Forward und 10 $\mu$ M Reverse Primer)	1,75
Template DNA (1-50 ng)	variiert
H <sub>2</sub> O	ad 25

**Tabelle 6-21: PCR-Programm der HRM-Analyse**

Programmschritt	Dauer	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	
Denaturierung	5 min	95	1 Zyklus
Denaturierung	10 sec	95	40 Zyklen
Annealing	30 sec	57	
Elongation	10 sec	72	
Schmelzkurve		65-95 $^{\circ}$ C in 0,1 $^{\circ}$ C Schritten	1 Zyklus

### 6.1.17 Bestimmung der Kopienanzahl im Genom

*Copy number variations* (CNV) bezeichnen eine strukturelle Variation des Genoms mit Abweichung der Kopienanzahl eines DNA-Abschnittes von den normalerweise zwei vorliegenden Kopien. Die Detektion von CNV kann unter anderem auch über eine quantitative PCR unter dem Einsatz genomischer DNA erfolgen. Dazu müssen die Primer- und Sondenkonzentrationen sowie die Reaktionsbedingungen der qPCR sorgfältig optimiert werden. Weiterhin ist die Reaktion in mindestens 5-facher Wiederholung und mit gleichzeitiger Expressionsbestimmung eines Haushaltsgens anzusetzen. Anhand einer Standardkurve wird aus dem Ct-Wert die Ausgangsmenge bestimmt.

#### Durchführung:

Die CNV-Analyse erfolgte mittels des „*TaqMan Universal PCR Mastermix*“ (Applied Biosystems, Darmstadt), HCK diente als Haushaltsgen. Für die Reaktionen wurden 25 ng genomische DNA eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6-13 aufgelistet.

**Tabelle 6-22: Pipettierschema CNV-Analyse**

Komponente	Menge [ $\mu$ l]
TaqMan Universal PCR Mastermix	12,5
Primer/Probe Mix GOI 10 x	2,5
Primer/Probe Mix HCK 10 x	2,5
DNA ca. 5 ng/ $\mu$ l	5
H <sub>2</sub> O	ad 25

**Tabelle 6-23: qPCR-Programm CNV-Analyse**

Programmschritt	Dauer	Temperatur [°C]	
	2 min	50°C	1 Zyklus
Denaturierung	10 min	95°C	
Denaturierung	15 sec	95°C	40-45 Zyklen
Annealing/ Elongation	1 min	60°C	

### 6.1.18 Gerichtete Klonierung in Expressionsvektoren

Zur gerichteten Klonierung eines Gens in einen Expressionsvektor wurde zunächst über LR-PCR von cDNA mittels Primer mit integrierten RE-Schnittstellen das gesuchte Gen amplifiziert. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau (siehe Kapitel 6.1.7) des PCR-Produktes sowie des Expressionsvektors. Um eine Religation zu vermeiden wurde der Expressionsvektor dephosphoryliert. Für die Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor, wurde ein Überschuss an Insert eingesetzt, dabei betrug das molare Verhältnis 1:5 (siehe Kapitel 6.1.9).

**Tabelle 6-24: CIP-Verdau**

	Menge
CIP 10000 U/ml	0,5 U / µg Vektor-DNA
linearisierter Vektor in NEB-Puffer 3	0,5 µg / 10 µl

Der linearisierte Vektor wurde in 1 x NEB-Puffer 3 resuspendieren und zusammen mit 0,5 U CIP (NEB, Frankfurt) pro µg Vektor-DNA bei 37°C für 60 min inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels des „QiaQuick PCR-Purification“-Kits oder einer Phenol-Extraktion aufgereinigt.

**Tabelle 6-25: PCR-Primer zur Klonierung von *EPHA7-FL* und *EPHA7-S***

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)	
F-Bam-EPHA7-FL	TTTGGATCCATGGTTTTTCAAACCTCGGTACCCTTC	64,01	Klonieren
R-Xho-EPHA7-FL	TTTCTCGAGTCACACTTGAATGCCAGTTCC	63,87	Klonieren
R-Xho-EPHA7-S	TTTCTCGAGGTAAGACACCTCACTTAGGTAGTCAC	65,14	Klonieren

### 6.1.19 Bakterienstämme und Kulturbedingungen

Zur Transformation und Vermehrung von Plasmid-Vektoren dienen die *E.coli* Stämme *One Shot TOP10*, *NEB 5α* und *SURE2 supercompetent*. Diese Bakterien sind chemisch kompetent und können über einen Hitzeschock transformiert werden. Bakterienmedien wurden entsprechend Tabelle 6-27 hergestellt.

**Tabelle 6-26: Verwendete Bakterienstämme**

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E.coli One Shot TOP 10</i>	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)



NEB 5- <i>alpha</i> Competent <i>E. coli</i>	<i>f</i> huA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	NEB, Frankfurt
SURE2 Supercompetent Cells	e14-(McrA <sup>-</sup> ) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(Kan <sup>r</sup> ) uvrC [F'proAB lac] <sup>q</sup> ZΔM15Tn10(Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup>	Stratagene (Agilent Technologies, Waldbronn)

### 6.1.20 Transformation rekombinanter DNA in kompetente *E. coli*-Bakterien

Als Transformation wird die Aufnahme von freier DNA in Bakterien bezeichnet. *Escherichia coli* eignet sich auf Grund der sehr kurzen Generationszeit besonders gut zur Vermehrung von Plasmiden.

#### Durchführung:

Die Transformation erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Zur blau/weiß Selektion der *TOP10* Bakterien wurde auf den LB-Amp-Agar Platten zuvor noch 40 µl X-Gal (40 mg/ml) und 40 µl IPTG (100 mM) verteilt. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz bzw. mit einem Plasmid gemischt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 Sek. Inkubation bei 42°C (Hitze-Schock) und anschließender zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien eine Stunde bei 37°C in SOC-Medium geschüttelt und anschließend auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

**Tabelle 6-27: Bakterienmedien**

SOC-Medium	Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
LB-Medium	5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, in 1 L H <sub>2</sub> O; sterilisiert durch Autoklavieren
LB-Amp-Medium	LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Agar	5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 1.5 % (w/v) Agar, in 1 L H <sub>2</sub> O; sterilisiert durch Autoklavieren; nach Abkühlen auf 50-60°C Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin
X-Gal	40 mg/ml in DMF
IPTG	100 mM, 100 mg auf 4 ml H <sub>2</sub> O

### 6.1.21 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die selektive Aufreinigung der Plasmide wurden die „*Plasmid Purification*“-Kits der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Plasmidisolierung basiert auf alkalischer Lyse der Bakterien, gefolgt von Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Bindung an Anionenaustauscher-Säulen. Nach Kultivierung im geeigneten Selektionsmedium werden die Bakterien, welche das gewünschte Plasmid replizieren, durch Zentrifugation pelletiert und einer alkalischen Lyse mit NaOH/SDS unterworfen. Dies führt zum Aufschluss der Bakterien und zur Denaturierung der bakteriellen Proteine. Sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA werden freigesetzt und ebenfalls denaturiert. Anschließend erfolgt die Neutralisierung des alkalischen Lysats

unter Hochsalzbedingungen. Hierbei renaturiert die Plasmid-DNA, während alle anderen makromolekularen Komponenten (DNA, Proteine, Membranbestandteile) als Präzipitat ausfallen. Anschließend wird das gereinigte Lysat auf einer Anionenaustauscher-Säule aufgetragen. Dabei beruht die Plasmidaufreinigung auf der Interaktion der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA mit den positiv geladenen DEAE-Gruppen (Diethylaminoethanol) der Säule. Aufgrund der hohen Ladungsdichte des Säulenmaterials kann doppelsträngige Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen bei neutralem bis schwach alkalischem pH-Wert selektiv eluiert werden.

### **Durchführung:**

LB-Medium mit geeigneten Selektionsmarkern wurde mit Einzelkolonien der Transformationen angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Nach Rückstellung eines Aliquots jedes Ansatzes wurden die transformierten Bakterien bei 4000 rpm, 10 min pelletiert. Je nach benötigter Plasmid-Menge und Reinheit wurde entweder das „*QIAprep Spin Miniprep*“-Kit oder das „*QIAGEN Plasmid Maxi*“-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

#### **6.1.21.1 Plasmidkontrolle**

Zur Überprüfung des Integrats wird das isolierte Plasmid mit passenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Restriktionsenzyme sind so zu wählen, dass vorzugsweise eine Schnittstelle im Insert liegt, so dass der Vektor nur linearisiert wird, wenn das Insert vorhanden ist. Alternativ können auch die Enzyme verwendet werden, mit deren Hilfe das Fragment in den Vektor hinein kloniert wurde. Die beim Restriktionsverdau entstehenden Fragmente wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### **6.1.22 Kryokonservierung von Bakterien**

10 ml einer Übernacht-Kultur wurden bei 4600 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500-1000 µl sterilem, 87 %igen Glycerin resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

#### **6.1.23 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und der Plasmid-DNA wurde vom Max-Planck-Institut in Köln übernommen. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Hilfe des BioEdit-Programms analysiert.

#### **6.1.24 Verwendete Vektoren**

Für die verschiedenen Klonierungsstrategien wurden der *pCR®2.1-TOPO®* -Vektor und als Expressionsvektor für Säugerzellen der *pcDNA3.1*-Vektor von Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte) verwendet. Der *pcDNA3.1*-Vektor hat eine Größe von 5,4 kb und ist für

high-level Expressionen optimiert. Eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) ermöglicht das Einfügen von Genen, der pUC origin und Ampicillin-Resistenz die Vervielfältigung des Vektor-Konstruktes und die positiven Selektion nach Transformation in *E.coli*. Der Vektor beinhaltet den Promotor des humanen Cytomegalovirus und eine BGH-Polyadenylierungssequenz, welche eine sehr starke Expression in eukaryotischen Zellen ermöglicht. Eine Neomycin/Zytocin-Resistenz kann zur Selektion in Säugetierzellen genutzt werden. Der *pCR®2.1-TOPO®* -Vektor ist für die direkte Klonierung von PCR-Produkten optimiert. Der Vektor ist bereits linearisiert mit einem 3'-T-Überhang zur TA-Klonierung von PCR-Produkten der Taq-Polymerase, deren Template-unabhängige terminale Transferaseaktivität einzelne Adenosine an die 3'-Enden der PCR-Produkte hinzufügt. Zudem befindet sich die Topoisomerase I kovalent an den Vektor gebunden. Diese katalysiert die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung zwischen dem Integrat und dem Plasmid.

**Tabelle 6-28: Klonierungsvektor/Ausgangsvektor**

Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
<i>pCR®2.1-TOPO®</i> - Vektor	prokaryotischer Vektor, amp <sup>r</sup> , Topoisomerase, T-Überhang	Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)

**Tabelle 6-29: Eukaryotischer Expressionsvektor**

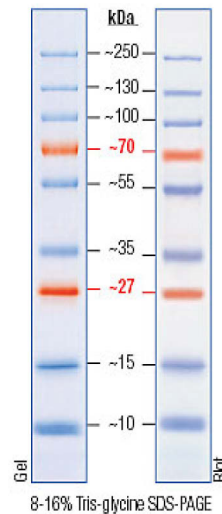
Plasmid	Relevante Merkmale	Referenz
<i>pcDNA3.1</i> -Vektor (pc3)	eukaryotischer Expressionsvektor, amp <sup>r</sup> , neo <sup>r</sup> , CMV-Promotor, MCS. pUC origin	Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)

## 6.2 Protein-Techniken

### 6.2.1 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, abgekürzt SDS-PAGE, nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Diese Methode unterliegt grundsätzlich den gleichen elektrophoretischen Trennprinzipien wie die Auftrennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld. Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine beruht auch hier auf der unterschiedlichen Größe. Um Proteine nach ihrer Größe trennen zu können, setzt man Natriumdodecylsulfat (SDS) zu. SDS ist ein negativ geladenes, amphiphatisches Detergenz, welches die nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren löst und sich über hydrophobe Wechselwirkungen proportional zum Molekulargewicht an die Proteine anlagert. Dies ermöglicht die Trennung der Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts und die Zuordnung ihrer Größe durch einen Größenmarker. Die Denaturierung der Proteine erfolgt durch SDS und Mercaptoethanol. Dieses zerstört aufgrund seiner reduzierenden Thiolverbindung die Disulfidbrücken zwischen Aminosäuren. Vor der gelelektrophoretischen

Trennung wird SDS und Mercaptoethanol in Form des Ladepuffers hinzugegeben und die Denaturierung durch Erhitzen der Probe auf 95°C für 5 min unterstützt.



**Abbildung 6-5: Proteingrößenstandard, PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Quelle: Fermentas)**

### Durchführung:

Das SDS-Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer von Biorad eingespannt und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die Zelllysate wurden 1:5 mit Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Die Proben wurden abzentrifugiert und der Überstand in die Geltaschen pipettiert. Zur Molekularmassenbestimmung wurde der Proteinmarker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus“ von Fermentas (ThermoFisher Scientific, Schwerte) aufgetragen. Nach dem Auftragen aller Proben wurde im Sammelgel eine Stromstärke von 70 V angelegt, die im Trenngel auf 110 V erhöht wurde.

SDS-Polyacrylamidgel	<i>Precast Pierce Protein Gels</i> von Pierce (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Zelllysate	siehe Kapitel 6.3.4
SDS-Ladepuffer (5x)	2,25 ml Tris (1M, pH 6,8), 5 ml Glycerin, 0,5 g SDS, 2,5 ml DTT (1 M), H <sub>2</sub> O ad 10 ml, 2 mg Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris (0,25 M), 144,1 g Glycin (1,918 M), 10 g SDS (1 %), H <sub>2</sub> O ad 1L, pH-Wert 8,8
Protein-Molekulargewichtsmarker	<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus</i> , Fermentas, St. Leon-Rot

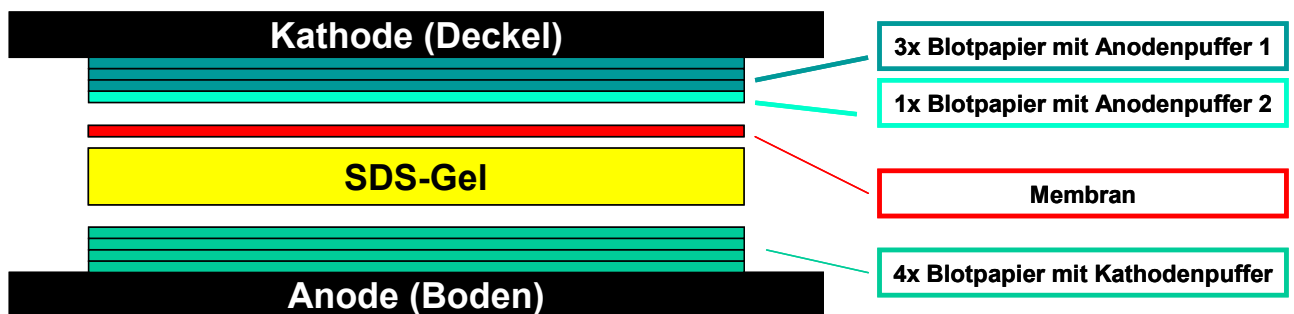
### 6.2.2 Western Blot

Beim Western-Blotting handelt es sich um ein Verfahren zum Transfer von Proteinen auf eine Membran. Dieses Verfahren ist Voraussetzung für den spezifischen Nachweis von Proteinen. Eine zunächst per SDS-PAGE aufgetrennte Proteinprobe wird aus dem Gel auf eine Membran transferiert und dort immobilisiert. In dieser Arbeit wurden PVDF-Membranen verwendet, da diese eine hohe mechanische Stabilität und eine gute Bindekapazität aufweisen.

### Durchführung

Nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine mit einer Semidry-Blot Apparatur (PeqLab, Erlangen) auf die PVDF-Membran transferiert. Bei dem Semidry-Blot handelt es sich um eine Elektroelution, deren elektrisches Feld senkrecht zum Gel verläuft. Vor dem Transfer wurde die Membran 1 min in 100 % Methanol aktiviert und anschließend mindestens 5 Minuten in Anodenpuffer 2 äquilibriert. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt und beides zwischen die mit entsprechenden Puffern getränkten Blotpapiere platziert (siehe Abbildung 6-6).

Komponente	
Anodenpuffer 1	300 mM Tris/HCl pH 10,4 in 20 %igem MeOH → 100 ml MeOH; 150 ml 1 M Tris/HCl pH 10,4 ad H <sub>2</sub> O 500 ml
Anodenpuffer 2:	30 mM Tris/HCl pH 10,4 in 20 %igem MeOH → 100 ml MeOH; 15 ml 1 M Tris/HCl pH 10,4 ad H <sub>2</sub> O 500 ml
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 9,4, 40 mM 6-Aminocaprinsäure in 20 %igem MeOH → 100 ml MeOH; 12,5 ml 1M Tris/HCl pH 9,4; 20 ml 1 M 6-Aminocaprinsäure (1 M: 7,6 g in 50 ml) ad H <sub>2</sub> O 500 ml
Roti® - PVDF-Membran	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
Whatman-Papier (Blotpapier)	ThermoFisher Scientific, Schwerte



**Abbildung 6-6: Schematischer Aufbau eines Semidry-Blots**

In Abhängigkeit von Größe und Anzahl der Gele sowie von der Größe der zu untersuchenden Proteine wurde Spannung und Blottingzeit angepasst. Beispielsweise erfolgte das Blotting eines Gels bei 80mA für eine Stunde.

### **6.2.3 Antikörpernachweis**

Spezifische Primärantikörper binden an die immobilisierten Proteine und werden über HRP-gekoppelte Sekundärantikörper detektiert. Die *horseradish peroxidase* (HRP) katalysiert die Umsetzung von Luminol bzw. deren Derivate in seine oxidierte Form.

### Durchführung:

Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation in 5 %iger Magermilchlösung für eine Stunde bei RT abgesättigt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper bei RT für eine Stunde oder bei 4°C über Nacht. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen und

bei RT für eine Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert. Durch dreimaliges Waschen wurde überschüssiger, nicht gebundener Sekundärantikörper entfernt. Die Detektion der HRP-Aktivität erfolgte mit dem „*ECLplus*“-Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei wurde die entstehende Chemolumineszenz über einen Röntgenfilm detektiert.

Blockierungs-/Inkubationspuffer für Antikörper	5 % Magermilch in PBS
Waschpuffer	0,1 % Tween 20 in 1x PBS
<i>ECLplus</i> -Lösung	Amersham Pharmacia, Freiburg
Antikörper-Lösungen	Siehe Tabelle 6-30 und Tabelle 6-31

**Tabelle 6-30: Verwendete Primärantikörper für Western-Blot-Analysen**

Antigen	Ursprung	Verdünnung	Verdünt in	Hersteller/Referenz
BLK	Maus	1:500	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
EGFR	Maus	1:1000	5 % Magermilch	Sigma Aldrich, München
EPHA7	Kaninchen	1:500	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
DDR1	Kaninchen	1:500	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
EPHA7	Kaninchen	1:200	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
ERBB4	Kaninchen	1:500	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
BLK	Maus	1:1000	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
FLT4	Maus	1:100	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
PDGFRB	Kaninchen	1:10.000	5 % Magermilch	Abcam, Cambridge
FGFR2	Kaninchen	1:1000	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
FGFR1	Maus	1:1000	5 % Magermilch	Abcam, Cambridge
FLT1	Maus	1:1000	5 % Magermilch	Abcam, Cambridge
PTK7	Ziege	1:1000	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
DDR1	Kaninchen	1:1000	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
ROR1	Kaninchen	1:1000	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
NTRK3	Maus	1:1000	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
ERBB4	Ziege	1:1000	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
EPHA7	Kaninchen	1:1000	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
FLT4	Maus	1:100	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
BLK	Maus	1:2000	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
Aktin	Kaninchen	1:5000	5 % Magermilch	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
GAPDH	Maus	1:10.000	5 % Magermilch	Biodesign, Asbach
β-Tubulin	Maus	1:5000	5 % Magermilch	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
ERBB4 c18	Kaninchen	1:500	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
Flg (C15-G)	Ziege	1:800	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
EPHA7	Kaninchen	1:200	5 % Magermilch	Santa Cruz, Heidelberg
NTRK3	Maus monoklonal	1:1000 – 1:2000	5 % Magermilch	ThermoFisher Scientific, Schwerte
LCK	Kaninchen	1:2000 4°C ü.N.	(5 % BSA) TBS, 0,1 % Tween 20	Cell Signaling, Frankfurt a.M.

**Tabelle 6-31: Verwendete Sekundärantikörper für Western-Blot.**

Antigen	Ursprung	Verdünnung	verdünnt in	enzym. Aktivität	Hersteller
IgG-Maus	Rind	1:1000	5 % Magermilch	HRP	Santa Cruz, Heidelberg
IgG-Kaninchen	Ziege	1:5000	5 % Magermilch	HRP	Santa Cruz, Heidelberg
IgG-Ziege	Esel	1:10000	5 % Magermilch	HRP	Santa Cruz, Heidelberg

### 6.2.4 Stripping der Western Blot Membran

Die auf einer Membran immobilisierten Proteine lassen sich zu mehreren Analysen einsetzen. Hierzu müssen die zuvor verwendeten Antikörper wieder entfernt werden.

#### Durchführung:

Zum Stripping der Western-Blot-Membran wurde der „*Restore Western Blot Stripping Buffer*“ von Pierce (ThermoFisher Scientific, Schwerte) verwendet. Die Membran wurde 15 min mit dem Stripping-Puffer bei RT inkubiert und anschließend dreimal 5 min mit Waschpuffer sorgfältig gewaschen. Im Anschluss wurde erneut mit Milchpulver-Lösung geblockt bevor die Inkubation mit weiteren Antikörpern erfolgte.

<i>Restore Western Blot Stripping Buffer</i>	Pierce (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Waschpuffer	0,1 % Tween 20, PBS

### 6.2.5 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mittels des „*BCA Protein Assay*“-Kits von Pierce (ThermoFisher Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben.

## 6.3 Zellkultur-Techniken

### 6.3.1 Kultivierung von Säugierzellen

#### 6.3.1.1 Zellpassage und Erhaltungskultur

Alle Arbeiten mit Säugerkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Um einem Wachstumsstopp der Zellen durch Kontaktinhibition vorzubeugen wurden die Suspensionszellen regelmäßig verdünnt (Passagieren). Alle Zelllinien wurden entsprechend den Angaben der ATCC (American Tissue Culture Collection) oder DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) kultiviert und passagiert. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer und die angestrebte Konzentration wurde über die Verdünnung mit neuem Medium erreicht. Die Inkubation der Zellen fand bei 37°C im Zellkulturbrutschrank unter 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre statt.

**Tabelle 6-32: Zellkulturmedien**

Medium	Zusatz
RPMI 1640 +	1 % Antibiotic-Antimycotic
DMEM ++	1 % Antibiotic-Antimycotic , 1 % Glutamin
BaF3-Medium	RPMI1640, 10 % FCS, 1 % Antibiotic-Antimycotic, 15 % WEH3B Zellkultur-Überstand, 50 µM β-Mercaptoethanol
IMEM ++	RPMI1640, 1 % Antibiotic-Antimycotic, 50 µM β-Mercaptoethanol

**Tabelle 6-33: Zellkultur-Materialien**

Medium/Kulturzusatz	Beschreibung	Hersteller
RPMI 1640 with stable Glutamin	Glucose 4500 mg/l, 1.5 g/L Na-Bikarbonat; Na-Pyruvat, 10 mM HEPES mit stabilen L-Glutamin	Biochrom, Berlin
α-MEM	ohne L-Glutamin, höhere Konzentration von: Aminosäuren, Liponsäure, Vitaminen und Pyruvat	Biochrom, Berlin
DMEM	Glucose 4500 mg/l, Na-Pyruvat, ohne L-Glutamin	Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Antibiotic-Antimycotic (100x)	10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Fungizone Antimycotic	Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
FCS	Fötales Kälberserum (FCS) Hitzeinaktivierung 30 min bei 56°C	Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
G418	50 mg/ml	Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Zeocin	100 ng/ml	Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)

**Tabelle 6-34: Übersicht der verwendeten Zelllinien**

Zelllinie	Gewebe/ Organismus	Medium	DSMZ Nr.	Zellkonzentration nach Passagieren/ Splitting-Verhältnis
Jurkat	T Lymphozyt, akute T-Zell Leukämie, Homo sapiens	RPMI++ FCS 10 %	ACC 282	3 x 10 <sup>5</sup>
Nalm 6	B Lymphozyt, akute Vorläufer Leukämie, Homo sapiens	RPMI++ FCS 10 %	ACC 128	5 x 10 <sup>5</sup>
Molt4	T-Lymphoblast, akute T-Zell Leukämie, Homo sapiens	RPMI++ FCS 20 %	ACC 362	3,5 x 10 <sup>5</sup>
KG1a	Myeloblast, AML, Homo sapiens	RPMI++ FCS 20 %	ACC 421	2 x 10 <sup>5</sup>
Kasumi	Myeloblast AML, 8;21 Translokation (AML1-ETO-Fusionsprotein), Homo sapiens	RPMI++ FCS 20 %	ACC 220	3 x 10 <sup>5</sup>
K562	Lymphoblast aus CML, Homo sapiens	RPMI+ FCS 20 %	ACC 10	1 x 10 <sup>5</sup>
Loucy	T-Lymphoblast, akute T-Zell Leukämie; SET-NUP214 Fusionsprotein, Homo sapiens	RPMI+ FCS 20 %	ACC 394	5 x 10 <sup>5</sup>
HPB-ALL	T-Lymphoblast, akute T-Zell Leukämie, Homo sapiens	RPMI+ FCS 20 %	ACC 483	1 x 10 <sup>6</sup>
RS4;11	B-Lymphozyt, akute Vorläufer Leukämie, Homo sapiens	RPMI+ FCS 10 %	ACC 508	5 x 10 <sup>5</sup>
BAF3	IL3 abhängige pro B-Zelllinie, mus musculus	BaF3 -Medium	ACC 300	1-3 x 10 <sup>5</sup>



WEHI-3B	IL3 produzierende myelomonozytische Leukämie, mus musculus	IMEM++ FCS 10 %	ACC 26	1:2 – 1:5
HeLa	Zervix Adenokarzinom, Homo sapiens	DMEM++ FCS 10 %	ACC 57	1:4 – 1:6
293T	Embryonales Nierengewebe, Homo sapiens	DMEM++ FCS 10 %	ACC 635	1:4 – 1:5
Vero	Normales adultes Nierengewebe, Cercopithecus aethiops	DMEM++ FCS 10 %	ACC 33	1:3 – 1:10

### 6.3.2 Kryokonservierung von Säugerzellen

Zellen können dauerhaft bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden. Zum Schutz der Zellen vor Kristallbildung sowie vor partieller Dehydration des Zytoplasmas wird dem Einfriermedium DMSO zugesetzt. DMSO ersetzt und bindet das Zellwasser. Serum hat ebenfalls einen schützenden Effekt auf eingefrorene Zellen.

#### Durchführung:

6 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Kryoröhrchen wurden aus der Zellkultur entnommen und bei 1100 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Nalgene, ThermoFisher Scientific, Schwerte) gestellt. Dieser Einfrierbehälter gewährleistet ein langsames Absinken der Temperatur und so ein schonendes Einfrieren um 1°C pro Minute im Gefrierschrank bis auf -80°C. Langfristig wurden eingefrorene Säugerzellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Einfriermedium	10 % DMSO in FCS
Kryoröhrchen	Nalgene, ThermoFisher Scientific, Schwerte

### 6.3.3 Auftauen von Säugerzellen

Um eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu bringen, ist beim Auftauen der Zellen darauf zu achten, dass dieser Schritt möglichst rasch geschieht. Da das beim Einfrieren verwendete DMSO toxisch für die Zellen ist, muss es schnell entfernt werden.

#### Durchführung:

Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, der Inhalt in 10 ml 37°C warmes Kulturmedium (entsprechend der Zelllinie) überführt und in einem Falcon-Röhrchen bei 1100 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet vorsichtig in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde die Zellkultur mikroskopisch untersucht und die Zellzahl eingestellt.

### 6.3.4 Herstellung von Zelllysaten

Die Lyse der Zellen zur Isolierung und Untersuchung von Proteinen erfolgte über einen chemischen Aufschluss. Der verwendete Lysepuffer enthält EDTA, das zweiwertige Kationen

wie  $\text{Ca}^{2+}$  bindet, welche zur Aufrechterhaltung der Zellmembran benötigt werden. Weiterhin ist im Puffer Natriumdeoxycholat, ein anionisches Tensid, und Triton-X-100 sowie SDS enthalten, die zur Solubilisierung der Membranlipide und Membranproteine beitragen. Um die Denaturierung und Degradation der isolierten Proteine zu verhindern, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt und unmittelbar vor der Proteinaufreinigung Proteaseinhibitoren hinzugegeben.

### **Durchführung:**

5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 300 µl RIPA-Puffer (+ Anti-Phosphatase, + Anti-Protease) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 30 min. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,2 - 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % (w/v) SDS, 0,5 % oder 1 % Na-Deoxycholat; 1 % Triton X-100, evtl. 1 mM EDTA, Protease-Inhibitor-Cocktail
für 100ml RIPA	5 ml 1 M Tris, pH 7,4 ; NaCl: 0,88 g, oder 3 ml NaCl (5 M) 1 ml SDS-Stock 10 %, 10 ml 10 % Na-Deoxycholat, 1 ml Triton X-100 → Ad 100 ml Aqua dest, steril filtrieren, bei 4°C dunkel lagern vor Gebrauch frisch hinzufügen 1:100: 100x Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim), evtl. 100x Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Cell Signaling, Frankfurt a.M.)

### **6.3.5 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Amaxa**

Bei der Transfektion eukaryotischer Zellen wird Fremd-DNA eingebracht. Es werden zwei Formen der Transfektion unterschieden, die transiente und die stabile Transfektion. Bei der transiente Transfektion wird die Fremd-DNA nur für einen kurzen Zeitraum in die Zelle eingebracht, da fremde DNA normalerweise schnell abgebaut wird. Bei der stabilen Transfektion wird die fremde DNA in das Genom der Wirtszelle integriert und stabil exprimiert. Je nach Zellart kommen verschiedene physikalische, chemische oder biologische Methoden in Frage. Physikalische Methoden sind zum Beispiel Mikroinjektion oder Elektroporation; chemische Verfahren nutzen Calcium-Phosphat-Präzipitation oder Lipofektion. Die Transfektion mit Amaxa stellt eine Elektroporation unter standardisierten Methoden dar.

### **Durchführung:**

Zum Einbringen von Fremd-DNA in Säugerzellen wurden die Lösungen der Firma Amaxa (Lonza, Köln) nach den *Nucleofector*® Protokollen der *Cell & Transfection Database* [6] im Elektroporator Amaxa verwendet. Die Zellen wurden so ausgesät, dass sich diese zum Zeitpunkt der Transfektion in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden und in einer Zellkonzentration von ca. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml vorlagen.

Die Suspensionszellen wurden zunächst bei 800 rpm für 10 min abzentrifugiert, das Medium entfernt und nach Herstellerangaben in Amaxa-Transfektionsreagenzien resuspendiert (siehe Tabelle 6-35), mit 2 µg Plasmid-DNA gemischt und im Amaxa-Elektroporator transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte die zeitgleiche Transfektion mit dem GFP exprimierenden Vektor *pMax*. Die transfizierten Zellen wurden anschließend sofort in 1,5 ml

warmes Medium aufgenommen. Die Transfektionseffizienz, d.h. der Anteil der lebenden und transfizierten Zellen, wurde am darauf folgenden Tag mittels FACS-Messung der GFP-Fluoreszenz bestimmt.

**Tabelle 6-35: Transfektionsbedingungen nach Lonza**

Zelllinie	Zellzahl/Transfektion	Amaya Solution	Transfektionsprogramm
Jurkat	1 x 10 <sup>6</sup>	Cell Line Nucleofector® Solution V	X-01
Molt 4	2 x 10 <sup>6</sup>	Cell Line Nucleofector® Solution R	C-05
Nalm 6	2 x 10 <sup>6</sup>	Cell Line Nucleofector® Solution T	C-05
BaF3	2 x 10 <sup>6</sup>	Cell Line Nucleofector® Solution V	X-01

### 6.3.6 Stabil transfizierte Zelllinien

Zur Herstellung stabil transfizierter Zellen wurden die transfizierten Zellen mit dem Selektionsmarker entsprechend des verwendeten Plasmids inkubiert (G418, Zeocin). So selektioniert man stabil transfizierte von transient transfizierten und untransfizierten Zellen. Da die stabilen Zellen oftmals das Resistenzgen, aber nicht das eingebrachte Gen exprimieren, wurden die Zellen vereinzelt. Von diesen Zellklonen wird die RNA isoliert und die Expression des Zielgens über quantitative PCR bestimmt.

**Tabelle 6-36: Konzentration der eingesetzten Selektionsmarker**

Zelllinie	Selektionsmarker	Konzentration
Jurkat	Zeocin (100 mg/ml), Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)	2 µl/ml
	G418 (50 mg/ml), Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)	8 µl/ml
Molt 4	Zeocin (100 mg/ml), Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)	1 µl/ml
	G418 (50 mg/ml), Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)	7,5 µl/ml
Nalm 6	Zeocin (100 mg/ml), Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte)	1,5 µl/ml
	G418 (50 mg/ml), Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)	5 µg/ml

### 6.3.7 Lymphozytenisolierung über Dichtegradientenzentrifugation

Aus Knochenmark und Blut können über Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll die mononukleären Zellen selektioniert werden. Die verdünnten Blut- oder Knochenmark-Proben werden dazu über das Ficoll geschichtet. Dieses wirkt während der Zentrifugation wie ein Filter, der für die Blutbestandteile in Abhängigkeit von deren Dichte unterschiedlich durchlässig ist. Die aggregierten Erythrozyten sedimentieren am Boden, darüber die Granulozyten während die weniger dichten mononukleären Zellen sich an der Interphase zwischen Ficoll und Plasma sammeln.

#### Durchführung

Das Knochenmark oder Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und vorsichtig auf das vorgelegte Ficoll (*Ficoll-Paque™ PLUS*; GE Healthcare, Freiburg) geschichtet (z.B. 12,5 ml Knochenmark + 12,5 ml PBS auf 20 ml Ficoll). Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte mit ausgeschalteter Bremse bei 2000 rpm und 4°C für 10 min. Im Gradienten entstehen vier

Schichten, die Phase zwischen Ficoll und Plasma, welche die Lymphozyten enthält wurde vorsichtig abgesaugt und in neues Röhrchen überführt. Diese Zellen wurden dann nochmals mit PBS gewaschen und in Zellkulturmedium überführt oder direkt weiterverwendet.

### 6.3.8 Magnetisch aktivierte Zellsortierung von CD34+, CD3+, CD19+ Leukozyten

CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, CD3+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen wurden durch Anwendung der magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS) isoliert (Milty et al., 1990). Bei dieser Methode werden mikroskopisch kleine magnetische Partikel (*MicroBeads*) mit Antikörpern konjugiert, die an Zellen mit entsprechenden Oberflächenmarkern binden. Die Zellsuspension wird auf MS oder LS Säulen (MACS® Column) geladen. Im Magnetfeld werden die unmarkierten Zellen ausgewaschen, während die an Microbeads gebundenen Zellen in der Säule bleiben. Nach der Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld, können die positiven Zellen eluiert werden.

#### Durchführung:

Die Separation erfolgte nach Herstellerangaben (Milty Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die Aufreinigung der CD34+ Stammzellen erfolgte aus dem Primärblut mehrerer Leukapheresen, welche bereits über CliniMACs angereicherte 1,07 % CD34+ Zellen enthielten. Die CD34+-Zellen wurden in zwei aufeinander folgenden Aufreinigungen doppelt selektiert. Die Aufreinigung der CD3+-Zellen erfolgte aus Knochenmarkproben nach vorheriger Entfernung der CD19+-Zellen. Die CD19+-Zellen wurden über zwei aufeinander folgende Antikörperbindungen isoliert. Die Reinheit der selektionierten Zellen wurde über FACS-Analysen überprüft.

CD34 MicroBeads, human	Milty Biotec, Bergisch Gladbach
CD19 MicroBeads, human	Milty Biotec, Bergisch Gladbach
CD3 MicroBeads, human	Milty Biotec, Bergisch Gladbach
MS und LS Säulen	Milty Biotec, Bergisch Gladbach
Ficoll aufgereinigte Lymphozyten	siehe Kapitel 6.3.7

### 6.3.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Im FACSCanto (Becton Dickinson, Heidelberg) werden die Zellen durch eine Kapillare in das Gerät eingesogen und dort von einem Argonlaser bestrahlt. Das Licht wird von Sammellinsen eingefangen und über verschiedene Spiegel und Filter an Detektoren weitergeleitet, welche Auskunft über Größe („*forward scatter*“, FSC), Granularität („*sideward scatter*“, SSC) und Fluoreszenz („*fluorescence detector*“, FL) geben. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist von dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff abhängig. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms CellQuest Pro (Becton Dickinson, Heidelberg).

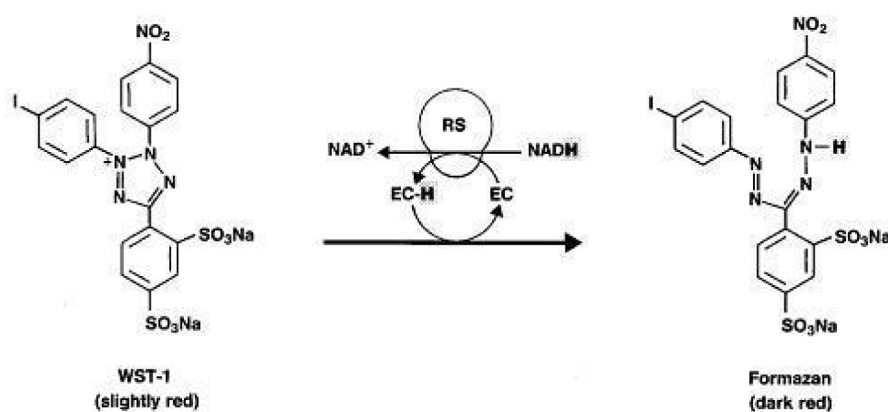
**Durchführung:**

Die Suspensionszellen wurden 8 min bei 1000 rpm und 4°C abzentrifugiert, das Medium entfernt und mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur FACS-Analyse auf Eis aufbewahrt.

DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
FACS-Puffer	PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA pH 8.0; 2 % FCS
FCS	Fötale Kälberserum (FCS), steril, Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Filter	50 µm CupFalcon (BD Bioscience, Heidelberg)
FACS-Röhrchen	5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol (BD Bioscience, Heidelberg)

**6.3.10 Zellviabilitätsanalyse mittels WST-1-Reagenz**

Die Zellviabilitätsanalyse mittels des WST-1 Reagenz (*water soluble tetrazolium*) ermöglicht die Quantifizierung von Zellproliferation, Zellüberleben und Zytotoxizität über eine colometrische Analyse. Als Probenmaterial können adhärenente und Suspensionszellen in 96-well Mikroplatten verwendet werden. In lebensfähigen Zellen schneidet die mitochondriale Dehydrogenase das Tetrazoliumsalzes der WST-1 Lösung, was zu Bildung des dunkelroten Formazans und einem Farbumschlag der Lösung führt. Die Spaltung und Reduktion von WST-1 erfolgt durch das Succinat-Tetrazolium Reduktase-System der mitochondrialen Atmungskette und ist von der Produktion von NAD(P)H abhängig. Daher korreliert die Menge an Formazan direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Mittels dieses Assays kann unter anderem der Effekt eines transformierten Gens auf das Zellwachstum verschiedener Zellen oder wachstumsinhibitorische Effekte von Zytostatika und anderen Medikamenten bestimmt werden.



**Abbildung 6-7: Spaltung des Tetrazoliumsalzes zu Formazan (Quelle: Roche, Mannheim)**

**Durchführung:**

Die Zellen wurden 24 Std. nach Transfektion in einer 100 µl Zellsuspension im 96-well Format ausgesät und mit verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren, Zytostatika und DMSO als negativ

Kontrolle für ein bis sechs Tage inkubiert. Dabei wurden Molt 4, Nalm 6, Jurkat und BaF3-Zellen in der Konzentration von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingesetzt. Der Ansatz erfolgte in 5-fachen Replikaten. Zur Bestimmung der lebenden Zellen wurde der Zellsuspension 20 µl einer 1:1 Medium/WST-1-Mischung hinzugegeben und diese vorsichtig resuspendiert. Nach einer Inkubation von 4 Std. bei 37°C erfolgte die photometrische Bestimmung des Farbumschlags über Messung der Absorption von Formazan bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels eines Multi-well Spektrometers (ELISA reader Sunrise™, Tecan, Crailsheim). Luftblasen im Medium können mehr Licht absorbieren als die Probe selbst. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurde bei starken Abweichungen zwischen den fünf Replikaten die Messung nach einiger Zeit nochmals durchgeführt.

Die Messung der Absorption nach Inkubation mit WST-1 erfolgte an sechs aufeinanderfolgenden Tagen. Zur Auswertung wurden die Daten der Tage ausgewählt, an denen sich die Zellen noch in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Material	Hersteller	eingesetzte Menge
WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	10 µl/100 µl Zellsuspension
Sorafenib	Selleckchem, München	1-20 µM
Lapatinib Ditosylate	Selleckchem, München	3-75 µM
Sunitinib Malat	Selleckchem, München	20-100 µM
Linifanib	Selleckchem, München	1-5 µM
AraC, Cytarabine	Selleckchem, München	0,5 µg/ml
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, München	variierend
Zellen und Medium	siehe Tabelle 6-34	

## 6.4 Mathematische Methoden und Software

### 6.4.1 DDCT-Methode

Mittels der DDCT-Methode (Schmittgen and Livak, 2008) lassen sich Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Proben bestimmen. Dazu wurden im ersten Schritt die Expressionswerte gegen zwei Haushaltsgene normalisiert, indem die Differenz zwischen dem untersuchten Gen (*gene of interest* GOI) und dem Mittelwert zweier Haushaltsgene (*housekeeping gene* HK) ermittelt wurde:  $DCt = Ct_{GOI} - Ct_{HK}$ . Im zweiten Schritt erfolgte der Vergleich der Leukämieproben mit dem DCt-Mittelwert einer Kontrollgruppe. Die Differenz DDCT entspricht dem Unterschied der DCt-Werte zwischen den Leukämieproben und dem DCt-Mittelwert der gesunden Proben. Als Haushaltsgene wurden die Gene *B2M* (*beta-2-microglobulin*) und *GUSB* (*beta-glucuronidase*) verwendet, deren konstante Expression in hämatopoetischen Zellen bereits nachgewiesen wurde (Beillard et al., 2003).

1.  $DCt = [Ct\text{-Wert des untersuchten Gens}] - [Ct\text{-Wert der Referenzgene (Mittelwert aus den Expressionsdaten von } B2M \text{ und } GUSB)]$
2.  $DDCt = [DCt\text{-Wert Patient}] - [DCt\text{ Kontrolle (gemittelter } DCt\text{-Wert der Knochenmarkproben von Normalpersonen)}]$

Negative DDCt-Werte entsprechen einer Überexpression, positive DDCt-Werte einer verringerten Expression im Vergleich zur Kontrolle. Den genauen Expressionsunterschied erhält man über den  $2^{-DDCt}$ -Wert. Ist beispielsweise die normalisierte Expression eines Gens in der Patientenprobe im Vergleich zur Kontrolle vier Ct-Werte früher messbar, ergibt sich ein negativer DDCt-Wert von -4. Ein DDCt-Wert von -4 entspricht einer 16-fachen Verstärkung der Expression.  $2^{-DDCt}$ -Werte  $> 1$  geben eine Expressionserhöhung wieder und  $2^{-DDCt}$ -Werte  $< 1$  entsprechen einer verringerten Expression.

Bei einem Unterschied der  $2^{-DCt}$ -Werte von einer Potenz, z.B.  $10^{-4}$  zu  $10^{-3}$ , liegt der Expressionsunterschied beim 10-fachen, bei zwei Potenzen beim 100-fachen. Die genaue Expressionsdifferenz  $2^{-DDCt}$  entspricht dem Quotientenwert  $2^{-DCt} \text{ ALL} / 2^{-DCt} \text{ NP}$ :

$$2^{-DDCt} = 2^{-(DCt_{\text{Patient}} - DCt_{\text{Normalpersonen}})} = 2^{-DCt} \text{ Patient} / 2^{-DCt} \text{ Kontrollen.}$$

Die statistische Signifikanz der abweichenden Expressionen wurde mittels eines zweiseitigen Mann-Whitney Tests der *GraphPad Prism 6* Software berechnet.

#### 6.4.2 HCL-Tree Multi Experiment Viewer

Mittels der Software *Multi experiment viewer V4.9* (MEV4.9) (Saeed et al., 2003) wurden sogenannte *Heatmaps* der DCt und DDCt-Werte erstellt. Dabei repräsentieren grüne Bereiche Gene, welche hoch exprimiert bzw. überexprimiert wurden und rote Bereiche niedrig exprimierte bzw. verringert exprimierte Gene. Eine dunkle Färbung entspricht einer mittleren bzw. unveränderten Expression.

Die Programm-Funktionen HCL-tree (*hierarchical clustering tree*), SOM (*self organisation map*) und KMC (*K-means clustering*) der MEV-Software erlaubten eine Gruppierung der Expressionsergebnisse, d.h. es wurden Cluster mit ähnlichen Expressionsprofilen erstellt. Zur Berechnung des DCt-HCL-sample-trees wurde die Metrik *Pearson Correlation* und der Fusionierungsalgorithmus *Complete-Linkage* verwendet und die *Leaf-Order* der Proben optimiert. Zur Berechnung des DDCt-HCL-sample-trees wurde die Metrik des euklidischen Abstands und der Fusionierungsalgorithmus *Complete-Linkage* verwendet und die *Leaf-Order* der Proben und Gene optimiert. Die gebildeten Cluster bestehen aus Proben, welche zueinander eine höhere Ähnlichkeit des Expressionsmusters aufweisen als zu den Proben anderer Cluster. Mittels der hierarchischen Clusteranalyse des HCL-trees werden ähnliche Expressionsmuster so gruppiert, dass Patientendaten mit den größten Übereinstimmungen in räumlicher Nähe angeordnet und über Verzweigungen zusammengefasst werden. Die Höhe

der Verzweigungen gibt dabei die Ähnlichkeit zwischen den Proben wieder: je niedriger diese liegen, desto ähnlicher ist das Expressionsprofil.

### 6.4.3 Software

Neben den Standard-Office-Programmen wurden folgende Programme genutzt:

DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm *BioEdit* (Department of Microbiology, North Carolina State University) analysiert. Die *SDS2.3* (Applied Biosystems) Software um die quantitative PCR im 96-well Format zu initialisieren, eine Analyse der Rohdaten der Expressions-Arrays erfolgte mit *DataAssist* (Applied Biosystems). Die *GraphPadPrism* Software wurde zur Erstellung von Graphen und zur Berechnung von Signifikanzen verwendet. Die Analyse der FACS-Daten erfolgte mittels des Programms *CellQuest Pro* (Becton Dickinson, Heidelberg). und *FlowJo* (FlowJo Data Analysis Software, Ashland, USA). Der *Multi Experiment Viewer* wurde zur Auswertung und Gruppierung der Expressionsdaten verwendet. *REST 2009* diente der Genexpressionsanalyse von Rotor-Gene Daten (Qiagen, Hilden).

Homologierecherchen mit DNA- und Proteinsequenzen sowie Vergleiche mit genomischer DNA erfolgten mit dem BLAST Programm [7]. Zur Genanalyse und Recherche, z.B. der genomischen Intron/Exon Sequenz oder bekannten SNPs, wurden die Internetseiten des NCBI [8], EMBL [9] und ENSEMBL [10] verwendet. Zur Berechnung von Schmelzpunkten sowie der Komplementarität von Primern wurde der *Oligonucleotide Properties Calculator* [11] und das Programm *Primer 3* [12] verwendet. DNA-Sequenz wurde mittels des *ExPASy translate-tool* in die Proteinsequenz übersetzt [13].

Die Vorhersage von CpG-Inseln wurde mittels des *CpG Island Searcher* [14] und *EMBOSS Cpgplot* von EMBL-EBI [15] durchgeführt. Restriktionsenzym-Schnittstellen wurden mit dem *NEBcutter V2.0* von New England Biolabs [16] bestimmt.

Informationen zu Zelllinien und Zellkulturbedingungen sind auf den Internetseiten von *Cell Lines Service GMBH* [17], *American Type Culture Collection* (ATCC) [18] und *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) [19] dargestellt.

Expressionsdaten anderer Untersuchungen sind zum Beispiel in der GEO Datenbank [20] oder bei BioGPS [21], Expressionsdaten speziell für Leukämien im *Leukemia Gene Atlas* [22] hinterlegt.



## 7 GERÄTE und CHEMIKALIEN

### 7.1 Geräte

Geräte	Hersteller/Vertrieb
Autoklav	Tuttnauer 5050 ELV, Breda
Amaga Nucleofector	Lonza, Basel
Bakterienbrutschrank	Gasboy C 40, Labotec, Mitrand
Einfrierhilfe	„Mr. Frosty“, Nalgene Labware, ThermoFisher Scientific; Schwerte
Elektrophoresekammer DNA, klein	Horizon 58 Gel Casting Systems, Life Technologies
Elektrophoresekammer DNA, groß	Horizon 11.14 Gel Casting Systems, Life Technologies
Elektrophoresekammer Protein	Elektrophoresesystem, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ELISA reader	ELISA reader Sunrise™, Tecan, Crailsheim
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa Healthcare GmbH, Köln
FACS Canto	Becton Dickinson, Heidelberg
Filmkassette	Okamoto, Langen
Gefrierschrank -80°C	Hera freeze Heraeus Holding GmbH, Hanau
Geldokumentation DNA	Multigenius Bioimage Syngene, Cambridge
Gelgießstand	Gießschiene PerfectBlue Mini S peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gradienten-Thermocycler	VWR, Darmstadt
Heizblock	Thermomixer comfort Eppendorf GmbH, Wesseling
Heiz- und Kühlblock	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	5417R, Eppendorf GmbH, Wessling
Luminometer	Luminoscan Ascent Thermo Labsystem, Dreieich
Magnetrührer	Ikamag RCT, Ika, Staufen
Micropipette Puller	Sutter Instruments CO., USA
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop (Zellkultur)	Nikon TMS, Nikon GmbH, Düsseldorf
Nanodrop	ThermoFisher Scientific; Schwerte
PCR-Thermocycler	Geneamp PCR System ABI Thermal Cycler, Applied Biosystems, Darmstadt 2400 Geneamp PCR System, Perkin Elmer, Rodgau 7900HT FastReal Time PCR Systems, Applied Biosystem, Life Technologies, Darmstadt
PCR-Gradienten Thermocycler	UnoCycler mit Gradientenblock, VWR Int. GmbH, Darmstadt
pH-Meter MP200	Mettler-Toledo GmbH Prozessanalytik, Steinbach
Real Time Cycler	Rotor Gene, Qiagen, Hilden
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Rollmixer	RollerMixer SRT6, Stuart scientific, Asbach
Schüttelinkubator	Certomat H B.Braun Biotech Int. GmbH, Melsungen
Schüttler	WS 10 Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Sterilbank	Hera Safe Heraeus Holding GmbH, Hanau
Stickstoff-Tank	GT 38 Omnilab AG, Mettmenden

Stromgeber	Power PacBio-Rad Laboratories GmbH, München
Tank-Blotter	PerfectBlue Tank Elektro Blotter Web S peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer	Eppendorf GmbH, Wesslingen
Ultraschallstab	Heinemann Ultraschall und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
UV-Tisch	Alpha Innotech Corporation Biozym
Vortexer	VWR VV3, VWR Int. GmbH, Darmstadt
Waagen	ABT 120-SDM, Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad	Polystat CC3, P.Huber Kältemaschinenbau GmbH, Kassel
Zellzähler	Casy 1 TT, Schärfe System, Innovatis AG, Bielefeld
Zellkulturbrutschrank	Hera Cell, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifugen	Fisherbrand- Tischzentrifugen, T ThermoFisher Scientific, Avanti JE-30-I, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld Universal 16R Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

## 7.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Vertrieb
6-Aminocaprinsäure	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphoress 30)	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
BSA 100x	New England Biolabs GmbH., Frankfurt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco, ThermoFisher Scientific, Schwerte
ECL, ECL-Plus	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Entwickler-Lösung	Imagine Medical, Sierra Blanca
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Ficoll	Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare, Freiburg
Fixierer-Lösung	Imagine Medical, Sierra Blanca
L-Glutamin	Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
Glykogen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Größenstandard, Protein	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
DNA-Größenstandards HyperLadder™ 1 kb	Bioline, Luckenwalde
DNA-Größenstandards HyperLadder™ 50 bp	Bioline, Luckenwalde
DNA-Größenstandards HyperLadder™ 25 bp	Bioline, Luckenwalde
DNA-Probenpuffer 5x	Bioline, Luckenwalde

Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Höchst 33342	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HCL, rauchend	Merck KG, Darmstadt
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH&Co KG, Karlsruhe
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Isopropanol	ThermoFisher Scientific, Schwerte
KCl	Merck KG, Darmstadt
Leptomycin B	Axxora Dtl. GmbH, Lörrach
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natrium-Acetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Paraformaldehyd	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
PBS, steril	Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Polyethylenimin PEI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin/Streptomycin	Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (100x)	Cell-Signaling, Frankfurt a.M.
Protease-Inhibitor-Mix	Diagnostics GmbH, Mannheim
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
ReBlotplus strong 10x Stripping	Chemicon International, Hofheim
TAE-Puffer 25x	VWR, Darmstadt
Takara-Lösung	Cambrex Bioscience, Lonza
TBE-Puffer 10x	VWR, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris	Neolab, Heidelberg
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TRIzol®	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Schwerte
Trypsin/EDTA	Gibco (ThermoFisher Scientific, Schwerte)
Trypton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween20	AppliChem GmbH, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid)	ThermoFisher Scientific, Schwerte

### 7.3 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen ThermoFisher Scientific (Schwerte), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen), Nalgene (ThermoFisher Scientific, Schwerte) und BD Bioscience Europe (Heidelberg) bezogen, Grundchemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth GmbH&Co KG (Karlsruhe), Selleckchem (München), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München). Zellkulturmedien und Zusätze stammten von Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte), Biochrom (Berlin) und Gibco (ThermoFisher

Scientific, Schwerte). Enzyme und Kits der Molekularbiologie sowie Größenstandards für DNA und Proteine stammen von New England BioLabs (NEB, Frankfurt), Bioline (Luckenwalde), BioRad (München), Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Schwerte), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Amersham Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Applied Biosystems (Darmstadt), Milteny-Biotec (Bergisch Gladbach) oder Roche (Mannheim).

## 8 VERZEICHNISSE

### 8.1 *Literaturverzeichnis*

Abram, C.L., and Courtneidge, S.A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp. Cell Res.* 254, 1–13.

Aifantis, I., Raetz, E., and Buonamici, S. (2008). Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 380–390.

Alam, A., Blanc, I., Gueguen-Dorbes, G., Duclos, O., Bonnin, J., Barron, P., Laplace, M.-C., Morin, G., Gaujarengues, F., Dol, F., et al. (2012). SAR131675, a potent and selective VEGFR-3-TK inhibitor with antilymphangiogenic, antitumoral, and antimetastatic activities. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1637–1649.

Amin, S., Parker, A., and Mann, J. (2008). ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1654–1658.

Andersson, A., Paulsson, K., Lilljebjörn, H., Lassen, C., Strömbeck, B., Heldrup, J., Behrendtz, M., Johansson, B., and Fioretos, T. (2008). FLT3 mutations in a 10 year consecutive series of 177 childhood acute leukemias and their impact on global gene expression patterns. *Genes. Chromosomes Cancer* 47, 64–70.

Aqeilan, R.I., Donati, V., Palamarchuk, A., Trapasso, F., Kaou, M., Pekarsky, Y., Sudol, M., and Croce, C.M. (2005). WW domain-containing proteins, WWOX and YAP, compete for interaction with ErbB-4 and modulate its transcriptional function. *Cancer Res.* 65, 6764–6772.

Arasada, R.R., and Carpenter, G. (2005). Secretase-dependent tyrosine phosphorylation of Mdm2 by the ErbB-4 intracellular domain fragment. *J. Biol. Chem.* 280, 30783–30787.

Arefi, M., García, J.L., Peñarrubia, M.J., Queizán, J.A., Hermosín, L., López-Corral, L., Megido, M., Giraldo, P., de las Heras, N., Vanegas, R.J., et al. (2012). Incidence and clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms displaying a PDGFRB rearrangement. *Eur. J. Haematol.* 89, 37–41.

Armstrong, S.A., and Look, A.T. (2005). Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 23, 6306–6315.

Ashton, J.M., Balys, M., Neering, S.J., Hassane, D.C., Cowley, G., Root, D.E., Miller, P.G., Ebert, B.L., McMurray, H.R., Land, H., et al. (2012). Gene sets identified with oncogene cooperativity analysis regulate in vivo growth and survival of leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 11, 359–372.

Aversa, C., Leone, F., Zucchini, G., Serini, G., Geuna, E., Milani, A., Valdembri, D., Martinello, R., and Montemurro, F. (2015). Linifanib: current status and future potential in cancer therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 15, 677–687.

Avilla, E., Guarino, V., Visciano, C., Liotti, F., Svelto, M., Krishnamoorthy, G., Franco, R., and Melillo, R.M. (2011). Activation of TYRO3/AXL tyrosine kinase receptors in thyroid cancer. *Cancer Res.* 71, 1792–1804.

Bain, B.J. (2010). Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB or FGFR1. *Haematologica* 95, 696–698.

Bantscheff, M., Eberhard, D., Abraham, Y., Bastuck, S., Boesche, M., Hobson, S., Mathieson, T., Perrin, J., Raida, M., Rau, C., et al. (2007). Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1035–1044.

Beillard, E., Pallisgaard, N., van der Velden, V.H.J., Bi, W., Dee, R., van der Schoot, E., Delabesse, E., Macintyre, E., Gottardi, E., Saglio, G., et al. (2003). Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using ‘real-time’ quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474–2486.

Benedito, R., Rocha, S.F., Woeste, M., Zamykal, M., Radtke, F., Casanovas, O., Duarte, A., Pytowski, B., and Adams, R.H. (2012). Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature* **484**, 110–114.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* **33**, 451–458.

Berdasco, M., and Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev. Cell* **19**, 698–711.

Bianco, R., Rosa, R., Damiano, V., Daniele, G., Gelardi, T., Garofalo, S., Tarallo, V., De Falco, S., Melisi, D., Benelli, R., et al. (2008). Vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 5069–5080.

Bisset, L.R., Lung, T.L., Kaelin, M., Ludwig, E., and Dubs, R.W. (2004). Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur. J. Haematol.* **72**, 203–212.

Blay, J.-Y., and von Mehren, M. (2011). Nilotinib: a novel, selective tyrosine kinase inhibitor. *Semin. Oncol.* **38 Suppl 1**, S3-9.

Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355–365.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–737.

Bose, P., and Ozer, H. (2009). Neratinib: an oral, irreversible dual EGFR/HER2 inhibitor for breast and non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **18**, 1735–1751.

Brissot, E., Labopin, M., Beckers, M.M., Socié, G., Rambaldi, A., Volin, L., Finke, J., Lenhoff, S., Kröger, N., Ossenkoppele, G.J., et al. (2015). Tyrosine kinase inhibitors improve long-term outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **100**, 392–399.

Bröske, A.-M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M.R., Mancini, E., Scheller, M., Kuhl, C., Enns, A., Prinz, M., Jaenisch, R., et al. (2009). DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat. Genet.* **41**, 1207–1215.

Brown, P., Levis, M., Shurtleff, S., Campana, D., Downing, J., and Small, D. (2005). FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* **105**, 812–820.

- Brown, P., Levis, M., McIntyre, E., Griesemer, M., and Small, D. (2006). Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* 20, 1368–1376.
- Brunner, A.M., Li, S., Fathi, A.T., Wadleigh, M., Ho, V.T., Collier, K., Connolly, C., Ballen, K.K., Cutler, C.S., Dey, B.R., et al. (2016). Haematopoietic cell transplantation with and without sorafenib maintenance for patients with FLT3-ITD acute myeloid leukaemia in first complete remission. *Br. J. Haematol.* 175, 496–504.
- Cader, F.Z., Vockerodt, M., Bose, S., Nagy, E., Brundler, M.-A., Kearns, P., and Murray, P.G. (2013). The EBV oncogene LMP1 protects lymphoma cells from cell death through the collagen-mediated activation of DDR1. *Blood*.
- Cain, J.A., Grisolan, J.L., Laird, A.D., and Tomasson, M.H. (2004). Complete remission of TEL-PDGFRB-induced myeloproliferative disease in mice by receptor tyrosine kinase inhibitor SU11657. *Blood* 104, 561–564.
- Cain, J.A., Xiang, Z., O’Neal, J., Kreisel, F., Colson, A., Luo, H., Hennighausen, L., and Tomasson, M.H. (2007). Myeloproliferative disease induced by TEL-PDGFRB displays dynamic range sensitivity to Stat5 gene dosage. *Blood* 109, 3906–3914.
- Calpe, E., Purroy, N., Carpio, C., Abrisqueta, P., Carabia, J., Palacio, C., Castellví, J., Crespo, M., and Bosch, F. (2013). ZAP-70 promotes the infiltration of malignant B-lymphocytes into the bone marrow by enhancing signaling and migration after CXCR4 stimulation. *PLoS One* 8, e81221.
- Casalou, C., Costa, A., Carvalho, T., Gomes, A.L., Zhu, Z., Wu, Y., and Dias, S. (2011). Cholesterol regulates VEGFR-1 (FLT-1) expression and signaling in acute leukemia cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 9, 215–224.
- Casella, I., Feccia, T., Chelucci, C., Samoggia, P., Castelli, G., Guerriero, R., Parolini, I., Petrucci, E., Pelosi, E., Morsilli, O., et al. (2003). Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood* 101, 1316–1323.
- Cenni, B., Gutmann, S., and Gottar-Guillier, M. (2012). BMX and its role in inflammation, cardiovascular disease, and cancer. *Int. Rev. Immunol.* 31, 166–173.
- Chang, Q., Jorgensen, C., Pawson, T., and Hedley, D.W. (2008). Effects of dasatinib on EphA2 receptor tyrosine kinase activity and downstream signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 99, 1074–1082.
- Charmsaz, S. (2013). Expression and Function of the Eph Receptor Family in Leukemia and Hematopoietic Malignancies: Prospects for Targeted Therapies. *J. Leuk.* 01.
- Chen, E., Staudt, L.M., and Green, A.R. (2012). Janus Kinase Deregulation in Leukemia and Lymphoma. *Immunity* 36, 529–541.
- Chen, J., Odenike, O., and Rowley, J.D. (2010). Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat. Rev. Cancer* 10, 23–36.
- Chiaretti, S., Li, X., Gentleman, R., Vitale, A., Wang, K.S., Mandelli, F., Foà, R., and Ritz, J. (2005). Gene expression profiles of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation and distinct mechanisms of transformation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 7209–7219.

Chiaretti, S., Guarini, A., De Propriis, M.S., Tavoraro, S., Intoppa, S., Vitale, A., Iacobelli, S., Elia, L., Ariola, C., Ritz, J., et al. (2006). ZAP-70 expression in acute lymphoblastic leukemia: association with the E2A/PBX1 rearrangement and the pre-B stage of differentiation and prognostic implications. *Blood* 107, 197–204.

Churchman, M.L., Evans, K., Richmond, J., Robbins, A., Jones, L., Shapiro, I.M., Pachter, J.A., Weaver, D.T., Houghton, P.J., Smith, M.A., et al. (2016). Synergism of FAK and tyrosine kinase inhibition in Ph+ B-ALL. *JCI Insight* 1.

Cimino, G., Elia, L., Mancini, M., Annino, L., Anaclerico, B., Fazi, P., Vitale, A., Specchia, G., Di Raimondo, F., Recchia, A., et al. (2003). Clinico-biologic features and treatment outcome of adult pro-B-ALL patients enrolled in the GIMEMA 0496 study: absence of the ALL1/AF4 and of the BCR/ABL fusion genes correlates with a significantly better clinical outcome. *Blood* 102, 2014–2020.

Continolo, S., Baruzzi, A., Majeed, M., Caveggion, E., Fumagalli, L., Lowell, C.A., and Berton, G. (2005). The proto-oncogene Fgr regulates cell migration and this requires its plasma membrane localization. *Exp. Cell Res.* 302, 253–269.

Creedon, H., and Brunton, V.G. (2012). Src kinase inhibitors: promising cancer therapeutics? *Crit. Rev. Oncog.* 17, 145–159.

Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marcé, S., López-Guillermo, A., Campo, E., and Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 1764–1775.

Dai, Y., Hartandi, K., Ji, Z., Ahmed, A.A., Albert, D.H., Bauch, J.L., Bouska, J.J., Bousquet, P.F., Cunha, G.A., Glaser, K.B., et al. (2007). Discovery of N-(4-(3-amino-1H-indazol-4-yl)phenyl)-N'-(2-fluoro-5-methylphenyl)urea (ABT-869), a 3-aminoindazole-based orally active multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* 50, 1584–1597.

Dawson, D.W., Hong, J.S., Shen, R.R., French, S.W., Troke, J.J., Wu, Y.-Z., Chen, S.-S., Gui, D., Regelson, M., Marahrens, Y., et al. (2007). Global DNA methylation profiling reveals silencing of a secreted form of EphA7 in mouse and human germinal center B-cell lymphomas. *Oncogene* 26, 4243–4252.

De Luca, A., and Normanno, N. (2010). Tivozanib, a pan-VEGFR tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of solid tumors. *IDrugs Investig. Drugs J.* 13, 636–645.

Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* 5, 275–284.

DeAngelo, D.J., Stone, R.M., Heaney, M.L., Nimer, S.D., Paquette, R.L., Klisovic, R.B., Caligiuri, M.A., Cooper, M.R., Lecerf, J.-M., Karol, M.D., et al. (2006). Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood* 108, 3674–3681.

Demarest, S.J., Gardner, J., Vendel, M.C., Ailor, E., Szak, S., Huang, F., Doern, A., Tan, X., Yang, W., Grueneberg, D.A., et al. (2013). Evaluation of Tyro3 expression, Gas6-mediated Akt phosphorylation, and the impact of anti-Tyro3 antibodies in melanoma cell lines. *Biochemistry (Mosc.)* 52, 3102–3118.

Deng, Y., Zhang, X., and Simons, M. (2015). Molecular Controls of Lymphatic VEGFR3 Signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 421–429.



- Despeaux, M., Labat, E., Gadelorge, M., Prade, N., Bertrand, J., Demur, C., Recher, C., Bonneville, P., Payastre, B., Bourin, P., et al. (2011). Critical features of FAK-expressing AML bone marrow microenvironment through leukemia stem cell hijacking of mesenchymal stromal cells. *Leukemia* 25, 1789–1793.
- Dias, S., Choy, M., Alitalo, K., and Rafii, S. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF)–C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 99, 2179–2184.
- Dibb, N.J., Dilworth, S.M., and Mol, C.D. (2004). Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nat. Rev. Cancer* 4, 718–727.
- Dielschneider, R.F., Xiao, W., Yoon, J.-Y., Noh, E., Banerji, V., Li, H., Marshall, A.J., Johnston, J.B., and Gibson, S.B. (2014). Gefitinib targets ZAP-70-expressing chronic lymphocytic leukemia cells and inhibits B-cell receptor signaling. *Cell Death Dis.* 5, e1439.
- Dong, S., Kang, S., Gu, T.-L., Kardar, S., Fu, H., Lonial, S., Khoury, H.J., Khuri, F., and Chen, J. (2007). 14-3-3 Integrates prosurvival signals mediated by the AKT and MAPK pathways in ZNF198-FGFR1-transformed hematopoietic cells. *Blood* 110, 360–369.
- Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W.N., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., et al. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 355, 2408–2417.
- Dutt, A., Ramos, A.H., Hammerman, P.S., Mermel, C., Cho, J., Sharifnia, T., Chande, A., Tanaka, K.E., Stransky, N., Greulich, H., et al. (2011). Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer. *PLoS One* 6, e20351.
- Dymecki, S.M., Niederhuber, J.E., and Desiderio, S.V. (1990). Specific expression of a tyrosine kinase gene, *blk*, in B lymphoid cells. *Science* 247, 332–336.
- Ebeid, E., Kamel, M., Moussa, H., and Galal, U. (2008). ZAP-70 as a possible prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Egypt. Natl. Cancer Inst.* 20, 121–126.
- Edling, C.E., and Hallberg, B. (2007). c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1995–1998.
- Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., Tojo, A., Morishita, K., Suzuki, K., Sato, Y., Kudoh, S., Tanaka, K., Setoyama, M., Nagamura, F., et al. (1999). Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* 93, 1355–1363.
- Eswaramoorthy, R., Wang, C.-K., Chen, W.-C., Tang, M.-J., Ho, M.-L., Hwang, C.-C., Wang, H.-M., and Wang, C.-Z. (2010). DDR1 regulates the stabilization of cell surface E-cadherin and E-cadherin-mediated cell aggregation. *J. Cell. Physiol.* 224, 387–397.
- Fabbro, D., Ruetz, S., Bodis, S., Pruschy, M., Csermak, K., Man, A., Campochiaro, P., Wood, J., O'Reilly, T., and Meyer, T. (2000). PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential. *Anticancer. Drug Des.* 15, 17–28.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., and Kantarjian, H.M. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 341, 164–172.
- Faderl, S., O'Brien, S., Pui, C.-H., Stock, W., Wetzler, M., Hoelzer, D., and Kantarjian, H.M. (2010). Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* 116, 1165–1176.

Fallah-Tafti, A., Foroumadi, A., Tiwari, R., Shirazi, A.N., Hangauer, D.G., Bu, Y., Akbarzadeh, T., Parang, K., and Shafiee, A. (2011). Thiazolyl N-benzyl-substituted acetamide derivatives: synthesis, Src kinase inhibitory and anticancer activities. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4853–4858.

Fathi, A.T., and Levis, M. (2009). Lestaurtinib: a multi-targeted FLT3 inhibitor. *Expert Rev. Hematol.* **2**, 17–26.

Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellström-Lindberg, E., Santini, V., Gattermann, N., Germing, U., Sanz, G., List, A.F., Gore, S., Seymour, J.F., et al. (2010). Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 562–569.

Ferrando, A.A., Neuberg, D.S., Staunton, J., Loh, M.L., Huard, C., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Pui, C.H., Downing, J.R., Gilliland, D.G., et al. (2002). Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**, 75–87.

Fiedler, W., Serve, H., Döhner, H., Schwittay, M., Ottmann, O.G., O’Farrell, A.-M., Bello, C.L., Allred, R., Manning, W.C., Cherrington, J.M., et al. (2005). A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood* **105**, 986–993.

Fiedler, W., Kayser, S., Kebenko, M., Janning, M., Krauter, J., Schittenhelm, M., Götze, K., Weber, D., Göhring, G., Tlealeu, V., et al. (2015). A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *Br. J. Haematol.* **169**, 694–700.

Fielder, W., Graeven, U., Ergün, S., Verago, S., Kilic, N., Stockschräder, M., and Hossfeld, D.K. (1997). Expression of FLT4 and its ligand VEGF-C in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **11**, 1234–1237.

Fischer, A., Picard, C., Chemin, K., Dogniaux, S., le Deist, F., and Hivroz, C. (2010). ZAP70: a master regulator of adaptive immunity. *Semin. Immunopathol.* **32**, 107–116.

Fragoso, R., Pereira, T., Wu, Y., Zhu, Z., Cabeçadas, J., and Dias, S. (2006). VEGFR-1 (FLT-1) activation modulates acute lymphoblastic leukemia localization and survival within the bone marrow, determining the onset of extramedullary disease. *Blood* **107**, 1608–1616.

Fuchs, E., and Segre, J.A. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell* **100**, 143–155.

Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., and Stratton, M.R. (2004). A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 177–183.

Garcia-Manero, G., Yang, H., Kuang, S.-Q., O’Brien, S., Thomas, D., and Kantarjian, H. (2009). Epigenetics of acute lymphocytic leukemia. *Semin. Hematol.* **46**, 24–32.

Gavine, P.R., Mooney, L., Kilgour, E., Thomas, A.P., Al-Kadhimi, K., Beck, S., Rooney, C., Coleman, T., Baker, D., Mellor, M.J., et al. (2012). AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res.* **72**, 2045–2056.

van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R.A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 251–337.

Gelman, I.H. (2011). Src-family tyrosine kinases as therapeutic targets in advanced cancer. *Front. Biosci. Elite Ed.* **3**, 801–807.

- Germani, A., Malherbe, S., and Rouer, E. (2003). The exon 7-spliced Lck isoform in T lymphocytes: a potential regulator of p56lck signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 680–685.
- Gilliland, D.G. (2001). Hematologic malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 189–191.
- Gilliland, D.G., and Griffin, J.D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* **100**, 1532–1542.
- Gilliland, D.G., Jordan, C.T., and Felix, C.A. (2004). The molecular basis of leukemia. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 80–97.
- Gilmore-Hebert, M., Ramabhadran, R., and Stern, D.F. (2010). Interactions of ErbB4 and Kap1 connect the growth factor and DNA damage response pathways. *Mol. Cancer Res. MCR* **8**, 1388–1398.
- Gleissner, B., Gökbuget, N., Bartram, C.R., Janssen, B., Rieder, H., Janssen, J.W.G., Fonatsch, C., Heyll, A., Voliotis, D., Beck, J., et al. (2002). Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* **99**, 1536–1543.
- Gnoni, A., Marech, I., Silvestris, N., Vacca, A., and Lorusso, V. (2011). Dasatinib: an anti-tumour agent via Src inhibition. *Curr. Drug Targets* **12**, 563–578.
- Gobessi, S., Laurenti, L., Longo, P.G., Sica, S., Leone, G., and Efremov, D.G. (2007). ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* **109**, 2032–2039.
- Gökbuget, N., and Hoelzer, D. (2009). Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* **46**, 64–75.
- Gökbuget, N., Kneba, M., Raff, T., Trautmann, H., Bartram, C.-R., Arnold, R., Fietkau, R., Freund, M., Ganser, A., Ludwig, W.-D., et al. (2012). Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood* **120**, 1868–1876.
- Golubkov, V.S., and Strongin, A.Y. (2012). Insights into ectodomain shedding and processing of protein-tyrosine pseudokinase 7 (PTK7). *J. Biol. Chem.* **287**, 42009–42018.
- Graux, C., Cools, J., Melotte, C., Quentmeier, H., Ferrando, A., Levine, R., Vermeesch, J.R., Stul, M., Dutta, B., Boeckx, N., et al. (2004). Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **36**, 1084–1089.
- Greuber, E.K., Smith-Pearson, P., Wang, J., and Pendergast, A.M. (2013). Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* *advance online publication*.
- Griswold, I.J., Shen, L.J., La Rosée, P., Demehri, S., Heinrich, M.C., Brazier, R.M., McGreevey, L., Haley, A.D., Giese, N., Druker, B.J., et al. (2004). Effects of MLN518, a dual FLT3 and KIT inhibitor, on normal and malignant hematopoiesis. *Blood* **104**, 2912–2918.
- Groffen, J., and Heisterkamp, N. (1987). The BCR/ABL hybrid gene. *Baillière's Clin. Haematol.* **1**, 983–999.

Gschwind, A., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 361–370.

Gu, T.-L., Goss, V.L., Reeves, C., Popova, L., Nardone, J., MacNeill, J., Walters, D.K., Wang, Y., Rush, J., Comb, M.J., et al. (2006). Phosphotyrosine profiling identifies the KG-1 cell line as a model for the study of FGFR1 fusions in acute myeloid leukemia. *Blood* 108, 4202–4204.

Guagnano, V., Furet, P., Spanka, C., Bordas, V., Le Douget, M., Stamm, C., Brueggen, J., Jensen, M.R., Schnell, C., Schmid, H., et al. (2011). Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J. Med. Chem.* 54, 7066–7083.

Guan, M., Xu, C., Zhang, F., and Ye, C. (2009). Aberrant methylation of EphA7 in human prostate cancer and its relation to clinicopathologic features. *Int. J. Cancer* 124, 88–94.

Guan, M., Liu, L., Zhao, X., Wu, Q., Yu, B., Shao, Y., Yang, H., Fu, X., Wan, J., and Zhang, W. (2011). Copy number variations of EphA3 are associated with multiple types of hematologic malignancies. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 11, 50–53.

Guillaume, N., Alleaume, C., Munfus, D., Capiod, J.-C., Touati, G., Pautard, B., Desablens, B., Lefrère, J.-J., Gouilleux, F., Lassoued, K., et al. (2005). ZAP-70 tyrosine kinase is constitutively expressed and phosphorylated in B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Haematologica* 90, 899–905.

Gurion, R., Vidal, L., Gafter-Gvili, A., Belnik, Y., Yeshurun, M., Raanani, P., and Shpilberg, O. (2010). 5-azacitidine prolongs overall survival in patients with myelodysplastic syndrome--a systematic review and meta-analysis. *Haematologica* 95, 303–310.

Hantschel, O., Rix, U., and Superti-Furga, G. (2008). Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk. Lymphoma* 49, 615–619.

Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B., Hicklin, D.J., Zhu, Z., Bohlen, P., Witte, L., et al. (2002). Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat. Med.* 8, 841–849.

Hayette, S., Chabane, K., Michallet, M., Michallat, E., Cony-Makhoul, P., Salesse, S., Maguer-Satta, V., Magaud, J.-P., and Nicolini, F.E. (2011). Longitudinal studies of SRC family kinases in imatinib- and dasatinib-resistant chronic myelogenous leukemia patients. *Leuk. Res.* 35, 38–43.

Heath, C., and Cross, N.C.P. (2004). Critical Role of STAT5 Activation in Transformation Mediated by ZNF198-FGFR1. *J. Biol. Chem.* 279, 6666–6673.

Heldin, C.-H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213–223.

Heldin, C.H., Ostman, A., and Rönstrand, L. (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1378, F79-113.

Hennequin, L.F., Allen, J., Breed, J., Curwen, J., Fennell, M., Green, T.P., Lambert-van der Brempt, C., Morgentin, R., Norman, R.A., Olivier, A., et al. (2006). N-(5-chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5-(tetrahydro-2H-pyran-4-yloxy)quinazolin-4-amine, a novel, highly selective, orally available, dual-specific c-Src/Abl kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* 49, 6465–6488.

- Hirabayashi, A., Mukaiyama, H., Kobayashi, H., Shiohara, H., Nakayama, S., Ozawa, M., Miyazawa, K., Misawa, K., Ohnota, H., and Isaji, M. (2009). Structure–activity relationship studies of 5-benzylaminoimidazo[1,2-c]pyrimidine-8-carboxamide derivatives as potent, highly selective ZAP-70 kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 284–294.
- Hisaoka, M., Sheng, W.-Q., Tanaka, A., and Hashimoto, H. (2002). Gene expression of TrkC (NTRK3) in human soft tissue tumours. *J. Pathol.* **197**, 661–667.
- Hoelzer, D., Gökbüget, N., Ottmann, O., Pui, C.-H., Relling, M.V., Appelbaum, F.R., van Dongen, J.J.M., and Szczepański, T. (2002). Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 162–192.
- Hoffbrand, A.V., Pettit, J.E., Moss, P.A., and Hoelzer, D. (2002). *Grundkurs Hämatologie* (Thieme, Georg, Verlag KG).
- Hojjat-Farsangi, M. (2014). Small-Molecule Inhibitors of the Receptor Tyrosine Kinases: Promising Tools for Targeted Cancer Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 13768–13801.
- Hubbard, S.R. (2004). Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 464–471.
- Hubbard, S.R., and Till, J.H. (2000). Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 373–398.
- Hunter, T. (2007). Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. *J. Clin. Invest.* **117**, 2036–2043.
- Iacobucci, I., Iraci, N., Messina, M., Lonetti, A., Chiaretti, S., Valli, E., Ferrari, A., Papayannidis, C., Paoloni, F., Vitale, A., et al. (2012). IKAROS Deletions Dictate a Unique Gene Expression Signature in Patients with Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS ONE* **7**.
- Issa, J.-P.J. (2007). DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 1634–1637.
- Izzedine, H., Buhaescu, I., Rixe, O., and Deray, G. (2007). Sunitinib malate. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **60**, 357–364.
- Jamil, M.O., Hathaway, A., and Mehta, A. (2015). Tivozanib: status of development. *Curr. Oncol. Rep.* **17**, 24.
- Jiang, G., Zhang, M., Yue, B., Yang, M., Carter, C., Al-Quran, S.Z., Li, B., and Li, Y. (2012). PTK7: A new biomarker for immunophenotypic characterization of maturing T cells and T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* **36**, 1347–1353.
- Jiang, X., Borgesi, R.A., McKnight, N.C., Kaur, R., Carpenter, C.L., and Balk, S.P. (2007). Activation of Nonreceptor Tyrosine Kinase Bmx/Etk Mediated by Phosphoinositide 3-Kinase, Epidermal Growth Factor Receptor, and ErbB3 in Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 32689–32698.
- Jin, W., Kim, B.-C., Tognon, C., Lee, H.-J., Patel, S., Lannon, C.L., Maris, J.M., Triche, T.J., Sorensen, P.H.B., and Kim, S.-J. (2005). The ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase suppresses TGF- $\beta$  signaling by inactivating the TGF- $\beta$  type II receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16239–16244.
- John S Jarboe, S.D. (2012). Mini-Review: Bmx Kinase Inhibitors for Cancer Therapy. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **8**.

Jones, F.E. (2008). HER4 intracellular domain (4ICD) activity in the developing mammary gland and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13, 247–258.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683–692.

Jones, S.F., Siu, L.L., Bendell, J.C., Cleary, J.M., Razak, A.R.A., Infante, J.R., Pandya, S.S., Bedard, P.L., Pierce, K.J., Houk, B., et al. (2015). A phase I study of VS-6063, a second-generation focal adhesion kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* 33, 1100–1107.

Jung, J.W., Ji, A.R., Lee, J., Kim, U.J., and Lee, S.T. (2002). Organization of the human PTK7 gene encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule and alternative splicing of its mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1579, 153–163.

Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V.W., Fang, G.H., Dumont, D., Breitman, M., and Alitalo, K. (1995). Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3566–3570.

Kalender Atak, Z., Gianfelici, V., Hulselmans, G., De Keersmaecker, K., Devasia, A.G., Geerdens, E., Mentens, N., Chiaretti, S., Durinck, K., Uyttebroeck, A., et al. (2013). Comprehensive Analysis of Transcriptome Variation Uncovers Known and Novel Driver Events in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS Genet.* 9.

Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., et al. (2008). A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* 26, 127–132.

Katsumi, A., Kiyoi, H., Abe, A., Tanizaki, R., Iwasaki, T., Kobayashi, M., Matsushita, T., Kaibuchi, K., Senga, T., Kojima, T., et al. (2011). FLT3/ITD regulates leukaemia cell adhesion through  $\alpha 4 \beta 1$  integrin and Pyk2 signalling. *Eur. J. Haematol.* 86, 191–198.

Kikushige, Y., Yoshimoto, G., Miyamoto, T., Iino, T., Mori, Y., Iwasaki, H., Niino, H., Takenaka, K., Nagafuji, K., Harada, M., et al. (2008). Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 7358–7367.

Kim, H.-G., Hwang, S.-Y., Aaronson, S.A., Mandinova, A., and Lee, S.W. (2011). DDR1 receptor tyrosine kinase promotes prosurvival pathway through Notch1 activation. *J. Biol. Chem.* 286, 17672–17681.

Kim, H.-G., Tan, L., Weisberg, E.L., Liu, F., Canning, P., Choi, H.G., Ezell, S.A., Wu, H., Zhao, Z., Wang, J., et al. (2013). Discovery of a Potent and Selective DDR1 Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* 8, 2145–2150.

Kim, L.C., Song, L., and Haura, E.B. (2009). Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 587–595.

Kitanaka, A., Mano, H., Conley, M.E., and Campana, D. (1998). Expression and activation of the nonreceptor tyrosine kinase Tec in human B cells. *Blood* 91, 940–948.

Kiyoi, H., and Naoe, T. (2002). FLT3 in human hematologic malignancies. *Leuk. Lymphoma* 43, 1541–1547.

Kolb, E.A., Pan, Q., Ladanyi, M., and Steinherz, P.G. (2003). Imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive leukemia of childhood. *Cancer* 98, 2643–2650.

- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661–672.
- Konopleva, M., Zhao, S., Hu, W., Jiang, S., Snell, V., Weidner, D., Jackson, C.E., Zhang, X., Champlin, R., Estey, E., et al. (2002). The anti-apoptotic genes Bcl-X(L) and Bcl-2 are over-expressed and contribute to chemoresistance of non-proliferating leukaemic CD34+ cells. *Br. J. Haematol.* **118**, 521–534.
- Krasnoperov, V., Kumar, S.R., Ley, E., Li, X., Scehnet, J., Liu, R., Zozulya, S., and Gill, P.S. (2010). Novel EphB4 Monoclonal Antibodies Modulate Angiogenesis and Inhibit Tumor Growth. *Am. J. Pathol.* **176**, 2029–2038.
- Krause, D.S., and Van Etten, R.A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* **353**, 172–187.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lafage-Pochitaloff, M., Baranger, L., Hunault, M., Cuccuini, W., Bidet, A., Dastugue, N., Tigaud, I., Henry, C., Gervais, C., Penther, D., et al. (2014). Value of Cytogenetic Abnormalities in Adult Patients with Philadelphia Chromosome (Ph)-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Treated in the Pediatric-Inspired Trials from the Group for Research on Adult ALL (GRAALL). *Blood* **124**, 492–492.
- Lafarge, S.T., Li, H., Pauls, S.D., Hou, S., Johnston, J.B., Gibson, S.B., and Marshall, A.J. (2015). ZAP70 expression directly promotes chronic lymphocytic leukaemia cell adhesion to bone marrow stromal cells. *Br. J. Haematol.* **168**, 139–142.
- Lan, Z., Wu, H., Li, W., Wu, S., Lu, L., Xu, M., and Dai, W. (2000). Transforming activity of receptor tyrosine kinase tyro3 is mediated, at least in part, by the PI3 kinase-signaling pathway. *Blood* **95**, 633–638.
- Lane, S.W., Scadden, D.T., and Gilliland, D.G. (2009). The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* **114**, 1150–1157.
- Le, Y., Xu, L., Lu, J., Fang, J., Nardi, V., Chai, L., and Silberstein, L.E. (2009). FAK silencing inhibits leukemogenesis in BCR/ABL-transformed hematopoietic cells. *Am. J. Hematol.* **84**, 273–278.
- Lee, H., Kim, M., Lim, J., Kim, Y., Han, K., Cho, B.-S., and Kim, H.-J. (2013). Acute myeloid leukemia associated with FGFR1 abnormalities. *Int. J. Hematol.* **97**, 808–812.
- Lee, H.J., Thompson, J.E., Wang, E.S., and Wetzler, M. (2011). Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment and future perspectives. *Cancer* **117**, 1583–1594.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134.
- Leoni, V., and Biondi, A. (2015). Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **100**, 295–299.
- Levis, M. (2014). Quizartinib for the treatment of FLT3/ITD acute myeloid leukemia. *Future Oncol. Lond. Engl.* **10**, 1571–1579.

Levis, M., Ravandi, F., Wang, E.S., Baer, M.R., Perl, A., Coutre, S., Erba, H., Stuart, R.K., Baccarani, M., Cripe, L.D., et al. (2011). Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood* 117, 3294–3301.

Levitzki, A. (2013). Tyrosine Kinase Inhibitors: Views of Selectivity, Sensitivity, and Clinical Performance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 161–185.

Li, S. (2007). Src kinase signaling in leukaemia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1483–1488.

Li, S., and Hua, Z.-C. (2008). FAK expression regulation and therapeutic potential. *Adv. Cancer Res.* 101, 45–61.

Liang, J., Tsui, V., Van Abbema, A., Bao, L., Barrett, K., Beresini, M., Berezhkovskiy, L., Blair, W.S., Chang, C., Driscoll, J., et al. (2013). Lead identification of novel and selective TYK2 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 67, 175–187.

Lilljebjörn, H., Rissler, M., Lassen, C., Heldrup, J., Behrendtz, M., Mitelman, F., Johansson, B., and Fioretos, T. (2012). Whole-exome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26, 1602–1607.

Lim, J.J., Yang, K., Taylor-Harding, B., Wiedemeyer, W.R., and Buckanovich, R.J. (2014). VEGFR3 inhibition chemosensitizes ovarian cancer stemlike cells through down-regulation of BRCA1 and BRCA2. *Neoplasia N. Y. N* 16, 343-353.e1-2.

Lim, S.-T., Miller, N.L.G., Nam, J.-O., Chen, X.L., Lim, Y., and Schlaepfer, D.D. (2010). Pyk2 inhibition of p53 as an adaptive and intrinsic mechanism facilitating cell proliferation and survival. *J. Biol. Chem.* 285, 1743–1753.

Linggi, B., and Carpenter, G. (2006). ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 281, 25373–25380.

Lipinski, C.A., and Loftus, J.C. (2010). Targeting Pyk2 for therapeutic intervention. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 95–108.

López-Nieva, P., Vaquero, C., Fernández-Navarro, P., González-Sánchez, L., Villa-Morales, M., Santos, J., Esteller, M., and Fernández-Piqueras, J. (2012). EPHA7, a new target gene for 6q deletion in T-cell lymphoblastic lymphomas. *Carcinogenesis* 33, 452–458.

Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J.A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B., et al. (2002). Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat. Med.* 8, 831–840.

Macdonald, D., Reiter, A., and Cross, N.C.P. (2002). The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1. *Acta Haematol.* 107, 101–107.

Maddigan, A., Truitt, L., Arsenault, R., Freywald, T., Allonby, O., Dean, J., Narendran, A., Xiang, J., Weng, A., Napper, S., et al. (2011). EphB receptors trigger Akt activation and suppress Fas receptor-induced apoptosis in malignant T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 5983–5994.

Malaise, M., Steinbach, D., and Corbacioglu, S. (2009). Clinical implications of c-Kit mutations in acute myelogenous leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 4, 77–82.



- Mallampati, S., Leng, X., Ma, H., Zeng, J., Li, J., Wang, H., Lin, K., Lu, Y., Yang, Y., Sun, B., et al. (2015). Tyrosine kinase inhibitors induce mesenchymal stem cell-mediated resistance in BCR-ABL+ acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 125, 2968–2973.
- Marathe, P., Tang, Y., Slecicka, B., Rodrigues, D., Gavai, A., Wong, T., Christopher, L., and Zhang, H. (2010). Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of BMS-690514, a potent inhibitor of EGFR and VEGFR2. *J. Pharm. Sci.* 99, 3579–3593.
- Marks, D.I., Paietta, E.M., Moorman, A.V., Richards, S.M., Buck, G., DeWald, G., Ferrando, A., Fielding, A.K., Goldstone, A.H., Ketterling, R.P., et al. (2009). T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults: clinical features, immunophenotype, cytogenetics, and outcome from the large randomized prospective trial (UKALL XII/ECOG 2993). *Blood* 114, 5136–5145.
- Mathisen, M.S., O'Brien, S., Thomas, D., Cortes, J., Kantarjian, H., and Ravandi, F. (2011). Role of tyrosine kinase inhibitors in the management of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 6, 187–194.
- McCabe, M.T., Brandes, J.C., and Vertino, P.M. (2009). Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 3927–3937.
- McCormack, P.L., and Keam, S.J. (2011). Dasatinib: a review of its use in the treatment of chronic myeloid leukaemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Drugs* 71, 1771–1795.
- Meng, L., Sefah, K., O'Donoghue, M.B., Zhu, G., Shangguan, D., Noorali, A., Chen, Y., Zhou, L., and Tan, W. (2010). Silencing of PTK7 in colon cancer cells: caspase-10-dependent apoptosis via mitochondrial pathway. *PloS One* 5, e14018.
- Miknyoczki, S.J., Chang, H., Klein-Szanto, A., Dionne, C.A., and Ruggeri, B.A. (1999). The Trk tyrosine kinase inhibitor CEP-701 (KT-5555) exhibits significant antitumor efficacy in preclinical xenograft models of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 2205–2212.
- Milani, L., Lundmark, A., Kiialainen, A., Nordlund, J., Flaegstad, T., Forestier, E., Heyman, M., Jonmundsson, G., Kanerva, J., Schmiegelow, K., et al. (2010). DNA methylation for subtype classification and prediction of treatment outcome in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115, 1214–1225.
- Miller, K.J., Day, B.W., El-Ajeh, F., Yarranton, G.T., Bebbington, C.R., Scott, A.M., Lackmann, M., and Boyd, A.W. (2013). EphA3 As a Target For Monoclonal Antibody Therapy For Acute Leukemia. *Blood* 122, 5013–5013.
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231–238.
- Minegishi, Y., Saito, M., Morio, T., Watanabe, K., Agematsu, K., Tsuchiya, S., Takada, H., Hara, T., Kawamura, N., Ariga, T., et al. (2006). Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 25, 745–755.
- Mitri, Z., Constantine, T., and O'Regan, R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother. Res. Pract.* 2012.

- Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Hemmati, H.D., Wright, D.E., and Weissman, I.L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Dev. Camb. Engl.* **124**, 1929–1939.
- Mullighan, C.G. (2011). Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **24**, 489–503.
- Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.B., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., et al. (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758–764.
- Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y., and Shibuya, M. (2006). Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* **108**, 1849–1856.
- Muralidhara, C., Ramachandran, A., and Jain, V.K. (2012). Abstract 3683: Crenolanib, a novel Type I, mutant-specific inhibitor of Class III receptor tyrosine kinases, preferentially binds to phosphorylated kinases. *Cancer Res.* **72**, 3683–3683.
- Muraoka-Cook, R.S., Sandahl, M.A., Strunk, K.E., Miraglia, L.C., Husted, C., Hunter, D.M., Elenius, K., Chodosh, L.A., and Earp, H.S. 3rd (2009). ErbB4 splice variants Cyt1 and Cyt2 differ by 16 amino acids and exert opposing effects on the mammary epithelium in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4935–4948.
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M.A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., and Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* **112**, 859–871.
- Nakanishi, H., Nakamura, T., Canaani, E., and Croce, C.M. (2007). ALL1 fusion proteins induce deregulation of EphA7 and ERK phosphorylation in human acute leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14442–14447.
- Neet, K., and Hunter, T. (1996). Vertebrate non-receptor protein–tyrosine kinase families. *Genes Cells* **1**, 147–169.
- Nguyen, P.T., Tsunematsu, T., Yanagisawa, S., Kudo, Y., Miyauchi, M., Kamata, N., and Takata, T. (2013). The FGFR1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal-epithelial transition through the transcription factor AP-1. *Br. J. Cancer* **109**, 2248–2258.
- Nguyen, T.M., Arthur, A., and Gronthos, S. (2015). The role of Eph/ephrin molecules in stromal-hematopoietic interactions. *Int. J. Hematol.*
- Nordlund, J., Milani, L., Lundmark, A., Lönnerholm, G., and Syvänen, A.-C. (2012). DNA Methylation Analysis of Bone Marrow Cells at Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukemia and at Remission. *PLoS ONE* **7**, e34513.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2–16.
- Oh, H.S., Kwon, H., Sun, S.K., and Yang, C.-H. (2002). QM, a Putative Tumor Suppressor, Regulates Proto-oncogene c-Yes. *J. Biol. Chem.* **277**, 36489–36498.
- Oricchio, E., and Wendel, H.-G. (2012). Mining the cancer genome uncovers therapeutic activity of EphA7 against lymphoma. *Cell Cycle Georget. Tex* **11**, 1076–1080.

- Oricchio, E., Nanjangud, G., Wolfe, A.L., Schatz, J.H., Mavrakis, K.J., Jiang, M., Liu, X., Bruno, J., Heguy, A., Olshen, A.B., et al. (2011). The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma. *Cell* 147, 554–564.
- Ovcharenko, A., Granot, G., Rokah, O.H., Park, J., Shpilberg, O., and Raanani, P. (2013). Enhanced adhesion/migration and induction of Pyk2 expression in K562 cells following imatinib exposure. *Leuk. Res.*
- Ozkal, S., Paterson, J.C., Tedoldi, S., Hansmann, M.-L., Kargi, A., Manek, S., Mason, D.Y., and Marafioti, T. (2009). Focal adhesion kinase (FAK) expression in normal and neoplastic lymphoid tissues. *Pathol. Res. Pract.* 205, 781–788.
- Padró, T., Bieker, R., Ruiz, S., Steins, M., Retzlaff, S., Bürger, H., Büchner, T., Kessler, T., Herrera, F., Kienast, J., et al. (2002). Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 16, 1302–1310.
- Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 165–180.
- Passamonti, F. (2014). PDGFRB disease: right diagnosis to prolong survival. *Blood* 123, 3526–3528.
- Passegué, E., Jamieson, C.H.M., Ailles, L.E., and Weissman, I.L. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 Suppl 1, 11842–11849.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573–580.
- Pawson, T., and Schlessingert, J. (1993). SH2 and SH3 domains. *Curr. Biol. CB* 3, 434–442.
- Pede, V., Rombout, A., Vermeire, J., Naessens, E., Vanderstraeten, H., Philippé, J., and Verhasselt, B. (2013). Expression of ZAP70 in chronic lymphocytic leukaemia activates NF-κB signalling. *Br. J. Haematol.* 163, 621–630.
- Peradziryi, H., Tolwinski, N.S., and Borchers, A. (2012). The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. *Arch. Biochem. Biophys.* 524, 71–76.
- Petersen, D.L., Krejsgaard, T., Berthelsen, J., Fredholm, S., Willerslev-Olsen, A., Sibbesen, N.A., Bonefeld, C.M., Andersen, M.H., Francavilla, C., Olsen, J.V., et al. (2014). B-lymphoid tyrosine kinase (Blk) is an oncogene and a potential target for therapy with dasatinib in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Leukemia* 28, 2109–2112.
- Playford, M.P., and Schaller, M.D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23, 7928–7946.
- Polverino, A., Coxon, A., Starnes, C., Diaz, Z., DeMelfi, T., Wang, L., Bready, J., Estrada, J., Cattley, R., Kaufman, S., et al. (2006). AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression in tumor xenografts. *Cancer Res.* 66, 8715–8721.
- Pratz, K.W., Cho, E., Levis, M.J., Karp, J.E., Gore, S.D., McDevitt, M., Stine, A., Zhao, M., Baker, S.D., Carducci, M.A., et al. (2010). A pharmacodynamic study of sorafenib in patients with relapsed and refractory acute leukemias. *Leukemia* 24, 1437–1444.

- Prebet, T., Lhoumeau, A.-C., Arnoulet, C., Aulas, A., Marchetto, S., Audebert, S., Puppo, F., Chabannon, C., Sainty, D., Santoni, M.-J., et al. (2010). The cell polarity PTK7 receptor acts as a modulator of the chemotherapeutic response in acute myeloid leukemia and impairs clinical outcome. *Blood* 116, 2315–2323.
- Prickett, T.D., Agrawal, N.S., Wei, X., Yates, K.E., Lin, J.C., Wunderlich, J., Cronin, J.C., Cruz, P., Rosenberg, S.A., and Samuels, Y. (2009). Analysis of the Tyrosine Kinome in Melanoma Reveals Recurrent Mutations in ERBB4. *Nat. Genet.* 41, 1127–1132.
- Pui, C.-H., Relling, M.V., and Downing, J.R. (2004). Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 350, 1535–1548.
- Qiu, C., Tarrant, M.K., Choi, S.H., Sathyamurthy, A., Bose, R., Banjade, S., Pal, A., Bornmann, W.G., Lemmon, M.A., Cole, P.A., et al. (2008). Mechanism of Activation and Inhibition of the HER4/ErbB4 Kinase. *Structure* 16, 460–467.
- Quentmeier, H., Eberth, S., Romani, J., Weich, H.A., Zaborski, M., and Drexler, H.G. (2012). DNA methylation regulates expression of VEGF-R2 (KDR) and VEGF-R3 (FLT4). *BMC Cancer* 12, 19.
- Rassi, F.E., and Khoury, H.J. (2013). Bosutinib: a SRC-ABL tyrosine kinase inhibitor for treatment of chronic myeloid leukemia. *Pharmacogenomics Pers. Med.* 6, 57–62.
- Ren, M., Qin, H., Ren, R., Tidwell, J., and Cowell, J.K. (2011). Src activation plays an important key role in lymphomagenesis induced by FGFR1 fusion kinases. *Cancer Res.* 71, 7312–7322.
- Ren, M., Qin, H., Ren, R., and Cowell, J.K. (2013). Ponatinib suppresses the development of myeloid and lymphoid malignancies associated with FGFR1 abnormalities. *Leukemia* 27, 32–40.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.
- Rix, U., Hantschel, O., Dürnberger, G., Remsing Rix, L.L., Planyavsky, M., Fernbach, N.V., Kaupe, I., Bennett, K.L., Valent, P., Colinge, J., et al. (2007). Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood* 110, 4055–4063.
- Rix, U., Remsing Rix, L.L., Terker, A.S., Fernbach, N.V., Hantschel, O., Planyavsky, M., Breitwieser, F.P., Herrmann, H., Colinge, J., Bennett, K.L., et al. (2010). A comprehensive target selectivity survey of the BCR-ABL kinase inhibitor INNO-406 by kinase profiling and chemical proteomics in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* 24, 44–50.
- Roberts, K.G., Morin, R.D., Zhang, J., Hirst, M., Zhao, Y., Su, X., Chen, S.-C., Payne-Turner, D., Churchman, M.L., Harvey, R.C., et al. (2012). Genetic Alterations Activating Kinase and Cytokine Receptor Signaling in High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* 22, 153–166.
- Roberts, K.G., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R.C., Yang, Y.-L., Pei, D., McCastlain, K., Ding, L., Lu, C., Song, G., et al. (2014). Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 371, 1005–1015.
- Roberts, W.G., Ung, E., Whalen, P., Cooper, B., Hulford, C., Autry, C., Richter, D., Emerson, E., Lin, J., Kath, J., et al. (2008). Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res.* 68, 1935–1944.

- Robinson, D.R., Wu, Y.M., and Lin, S.F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19, 5548–5557.
- Roll, J.D., and Reuther, G.W. (2012). ALK-Activating Homologous Mutations in LTK Induce Cellular Transformation. *PLoS ONE* 7, e31733.
- Röllig, C., Serve, H., Hüttmann, A., Noppeney, R., Müller-Tidow, C., Krug, U., Baldus, C.D., Brandts, C.H., Kunzmann, V., Einsele, H., et al. (2015). Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.*
- Rothlin, C.V., Carrera-Silva, E.A., Bosurgi, L., and Ghosh, S. (2015). TAM Receptor Signaling in Immune Homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 355–391.
- Rudloff, U., and Samuels, Y. (2010). A growing family: adding mutated Erbb4 as a novel cancer target. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 1487–1503.
- Ruhe, J.E., Streit, S., Hart, S., Wong, C.-H., Specht, K., Knyazev, P., Knyazeva, T., Tay, L.S., Loo, H.L., Foo, P., et al. (2007). Genetic Alterations in the Tyrosine Kinase Transcriptome of Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* 67, 11368–11376.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 34, 374–378.
- Salmond, R.J., Filby, A., Qureshi, I., Caserta, S., and Zamoyska, R. (2009). T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol. Rev.* 228, 9–22.
- Sanam, R., Vadivelan, S., Tajne, S., Narasu, L., Rambabu, G., and Jagarlapudi, S.A.R.P. (2009). Discovery of potential ZAP-70 kinase inhibitors: pharmacophore design, database screening and docking studies. *Eur. J. Med. Chem.* 44, 4793–4800.
- Sanda, T., Tyner, J.W., Gutierrez, A., Ngo, V.N., Glover, J., Chang, B.H., Yost, A., Ma, W., Fleischman, A.G., Zhou, W., et al. (2013). TYK2-STAT1-BCL2 pathway dependence in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov.* 3, 564–577.
- Sanford, D.S., Kantarjian, H., O'Brien, S., Jabbour, E., Cortes, J., and Ravandi, F. (2015). The role of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 15, 365–373.
- Sardi, S.P., Murtie, J., Koirala, S., Patten, B.A., and Corfas, G. (2006). Presenilin-Dependent ErbB4 Nuclear Signaling Regulates the Timing of Astrocytogenesis in the Developing Brain. *Cell* 127, 185–197.
- Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C.L., Wilkinson, G.A., Pitulescu, M.E., Acker, T., and Acker-Palmer, A. (2010). Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 465, 487–491.
- Scadden, D.T. (2007). The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 20, 19–27.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211–225.
- Schlessinger, J. (2004). Common and Distinct Elements in Cellular Signaling via EGF and FGF Receptors. *Science* 306, 1506–1507.

Schmidt-Arras, D., Schwäble, J., Böhmer, F.-D., and Serve, H. (2004). Flt3 receptor tyrosine kinase as a drug target in leukemia. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1867–1883.

Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.

Schultze, A., and Fiedler, W. (2010). Therapeutic potential and limitations of new FAK inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 19, 777–788.

Sciacca, L., Mineo, R., Pandini, G., Murabito, A., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2002). In IGF-I receptor-deficient leiomyosarcoma cells autocrine IGF-II induces cell invasion and protection from apoptosis via the insulin receptor isoform A. *Oncogene* 21, 8240–8250.

Secker-Walker, L.M., Craig, J.M., Hawkins, J.M., and Hoffbrand, A.V. (1991). Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. *Leukemia* 5, 196–199.

Serve, H., Krug, U., Wagner, R., Sauerland, M.C., Heinecke, A., Brunnberg, U., Schaich, M., Ottmann, O., Duyster, J., Wandt, H., et al. (2013). Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 3110–3118.

Shankar, D.B., Li, J., Tapang, P., Owen McCall, J., Pease, L.J., Dai, Y., Wei, R.-Q., Albert, D.H., Bouska, J.J., Osterling, D.J., et al. (2007). ABT-869, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor: inhibition of FLT3 phosphorylation and signaling in acute myeloid leukemia. *Blood* 109, 3400–3408.

Shawver, L.K., Slamon, D., and Ullrich, A. (2002). Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1, 117–123.

Shewchuk, L.M., Hassell, A.M., Ellis, B., Holmes, W.D., Davis, R., Horne, E.L., Kadwell, S.H., McKee, D.D., and Moore, J.T. (2000). Structure of the Tie2 RTK domain: self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and C-terminal tail. *Struct. Lond. Engl.* 1993 8, 1105–1113.

Shibuya, M. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 9, 225–230; discussion 231.

Slichenmyer, W.J., Elliott, W.L., and Fry, D.W. (2001). CI-1033, a pan-erbB tyrosine kinase inhibitor. *Semin. Oncol.* 28, 80–85.

Smith, L.M., Walsh, P.T., Rüdiger, T., Cotter, T.G., Mc Carthy, T.V., Marx, A., and O'Connor, R. (2004). EphA3 is induced by CD28 and IGF-1 and regulates cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 292, 295–303.

Sohal, J., Chase, A., Mould, S., Corcoran, M., Oscier, D., Iqbal, S., Parker, S., Welborn, J., Harris, R.I., Martinelli, G., et al. (2001). Identification of four new translocations involving FGFR1 in myeloid disorders. *Genes. Chromosomes Cancer* 32, 155–163.

Sohn, S.J., Barrett, K., Van Abbema, A., Chang, C., Kohli, P.B., Kanda, H., Smith, J., Lai, Y., Zhou, A., Zhang, B., et al. (2013). A restricted role for TYK2 catalytic activity in human cytokine responses revealed by novel TYK2-selective inhibitors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 2205–2216.

Somervaille, T.C.P., and Cleary, M.L. (2006). Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 257–268.

- Song, G., Li, Y., and Jiang, G. (2012). Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets (Review). *Oncol. Rep.* 28, 1935–1944.
- Stone, R.M., Fischer, T., Paquette, R., Schiller, G., Schiffer, C.A., Ehninger, G., Cortes, J., Kantarjian, H.M., DeAngelo, D.J., Huntsman-Labed, A., et al. (2012). Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 26, 2061–2068.
- Sudol, M. (2014). Neuregulin 1-activated ERBB4 as a “dedicated” receptor for the Hippo-YAP pathway. *Sci. Signal.* 7, pe29.
- Sundvall, M., Iljin, K., Kilpinen, S., Sara, H., Kallioniemi, O.-P., and Elenius, K. (2008a). Role of ErbB4 in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13, 259–268.
- Sundvall, M., Korhonen, A., Paatero, I., Gaudio, E., Melino, G., Croce, C.M., Aqeilan, R.I., and Elenius, K. (2008b). Isoform-specific monoubiquitination, endocytosis, and degradation of alternatively spliced ErbB4 isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4162–4167.
- Sundvall, M., Veikkolainen, V., Kurppa, K., Salah, Z., Tvorogov, D., van Zoelen, E.J., Aqeilan, R., and Elenius, K. (2010). Cell death or survival promoted by alternative isoforms of ErbB4. *Mol. Biol. Cell* 21, 4275–4286.
- Szilvassy, S.J. (2003). The biology of hematopoietic stem cells. *Arch. Med. Res.* 34, 446–460.
- Taguchi, T., Kiyokawa, N., Sato, N., Saito, M., and Fujimoto, J. (2000). Characteristic expression of Hck in human B-cell precursors. *Exp. Hematol.* 28, 55–64.
- Talab, F., Allen, J.C., Thompson, V., Lin, K., and Slupsky, J.R. (2013). LCK is an important mediator of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 11, 541–554.
- Tam, W.F., Ring, J.E., Trombino, A.F., Weaver, D.T., Pachter, J.A., Padval, M., and Xu, Q. (2014). VS-4718, a Potent Focal Adhesion Kinase (FAK) Inhibitor, Exhibits Anticancer Activity in Leukemia Models in Vitro and in Vivo. *Blood* 124, 982–982.
- Taylor, J.G. 6th, Cheuk, A.T., Tsang, P.S., Chung, J.-Y., Song, Y.K., Desai, K., Yu, Y., Chen, Q.-R., Shah, K., Youngblood, V., et al. (2009). Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J. Clin. Invest.* 119, 3395–3407.
- Tefferi, A., and Pardanani, A. (2004). Imatinib therapy in clonal eosinophilic disorders, including systemic mastocytosis. *Int. J. Hematol.* 79, 441–447.
- Tefferi, A., and Vardiman, J.W. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22, 14–22.
- Thomas, D.A., O'Brien, S.M., Faderl, S., Kashani, F.R., Wierda, W.G., Andreeff, M., Garris, R.S., Champlin, R.E., Cortes, J.E., and Kantarjian, H. (2010). Long-term outcome after hyper-CVAD and imatinib (IM) for de novo or minimally treated Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph-ALL). *J. Clin. Oncol.* 28:15s.
- Toffalini, F., Hellberg, C., and Demoulin, J.-B. (2010). Critical role of the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) beta transmembrane domain in the TEL-PDGFRbeta cytosolic oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 285, 12268–12278.

Tognon, C., Garnett, M., Kenward, E., Kay, R., Morrison, K., and Sorensen, P.H.B. (2001). The Chimeric Protein Tyrosine Kinase ETV6-NTRK3 Requires both Ras-Erk1/2 and PI3-Kinase-Akt Signaling for Fibroblast Transformation. *Cancer Res.* **61**, 8909–8916.

Tomlinson, D.C., Baxter, E.W., Loadman, P.M., Hull, M.A., and Knowles, M.A. (2012). FGFR1-induced epithelial to mesenchymal transition through MAPK/PLC $\gamma$ /COX-2-mediated mechanisms. *PloS One* **7**, e38972.

Tretter, T., Ross, A.E., Dordai, D.I., and Desiderio, S. (2003). Mimicry of pre-B cell receptor signaling by activation of the tyrosine kinase Blk. *J. Exp. Med.* **198**, 1863–1873.

Trimaldi, J., Carballido, E.M., Bowers, J.W., Anguiano, A.L., Zhang, Z.J., Shah, B.D., Bruno, S., List, A.F., Moscinski, L.C., Grady, T., et al. (2013). B-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma Associated with t(8;13)(p11;q12)/ ZMYM2 (ZNF198)-FGFR1 : Rare Case and Review of the Literature. *Acta Haematol.* **130**, 127–134.

Trinks, C., Severinsson, E.A., Holmlund, B., Gréen, A., Gréen, H., Jönsson, J.-I., Hallbeck, A.-L., and Walz, T.M. (2011). The pan-ErbB tyrosine kinase inhibitor canertinib induces caspase-mediated cell death in human T-cell leukemia (Jurkat) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 422–427.

Tsai, Y.T., Su, Y.H., Fang, S.S., Huang, T.N., Qiu, Y., Jou, Y.S., Shih, H.M., Kung, H.J., and Chen, R.H. (2000). Etk, a Btk family tyrosine kinase, mediates cellular transformation by linking Src to STAT3 activation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2043–2054.

Tse, K.W.K., Dang-Lawson, M., Lee, R.L., Vong, D., Bulic, A., Buckbinder, L., and Gold, M.R. (2009). B Cell Receptor-induced Phosphorylation of Pyk2 and Focal Adhesion Kinase Involves Integrins and the Rap GTPases and Is Required for B Cell Spreading. *J. Biol. Chem.* **284**, 22865–22877.

Tse, K.W.K., Lin, K.B.L., Dang-Lawson, M., Guzman-Perez, A., Aspnes, G.E., Buckbinder, L., and Gold, M.R. (2012). Small molecule inhibitors of the Pyk2 and FAK kinases modulate chemoattractant-induced migration, adhesion and Akt activation in follicular and marginal zone B cells. *Cell. Immunol.* **275**, 47–54.

Tsimafeyeu, I., Demidov, L., Stepanova, E., Wynn, N., and Ta, H. (2011). Overexpression of fibroblast growth factor receptors FGFR1 and FGFR2 in renal cell carcinoma. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **45**, 190–195.

Ueno, H., Honda, H., Nakamoto, T., Yamagata, T., Sasaki, K., Miyagawa, K., Mitani, K., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1997). The phosphatidylinositol 3' kinase pathway is required for the survival signal of leukocyte tyrosine kinase. *Oncogene* **14**, 3067–3072.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203–212.

Vainchenker, W., Dusa, A., and Constantinescu, S.N. (2008). JAKs in pathology: Role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 385–393.

Valiathan, R.R., Marco, M., Leitinger, B., Kleer, C.G., and Fridman, R. (2012). Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 295–321.

Van Vlierberghe, P., and Ferrando, A. (2012). The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* **122**, 3398–3406.



Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937–951.

Varney, M.L., and Singh, R.K. (2015). VEGF-C-VEGFR3/Flt4 axis regulates mammary tumor growth and metastasis in an autocrine manner. *Am. J. Cancer Res.* 5, 616–628.

Vázquez-Franco, J.E., Reyes-Maldonado, E., Vela-Ojeda, J., Domínguez-López, M.L., and Lezama, R.A. (2012). Src, Akt, NF-κB, BCL-2 and c-IAP1 may be involved in an anti-apoptotic effect in patients with BCR-ABL positive and BCR-ABL negative acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* 36, 862–867.

Veikkolainen, V., Vaparanta, K., Halkilahti, K., Iljin, K., Sundvall, M., and Elenius, K. (2011). Function of ERBB4 is determined by alternative splicing. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 2647–2657.

Vilas-Zornoza, A., Agirre, X., Martín-Palanco, V., Martín-Subero, J.I., San José-Eneriz, E., Garate, L., Álvarez, S., Miranda, E., Rodríguez-Otero, P., Rifón, J., et al. (2011). Frequent and simultaneous epigenetic inactivation of TP53 pathway genes in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 6, e17012.

Vogel, W.F. (2002). Ligand-induced shedding of discoidin domain receptor 1. *FEBS Lett.* 514, 175–180.

Wahner Hendrickson, A.E., Haluska, P., Schneider, P.A., Loegering, D.A., Peterson, K.L., Attar, R., Smith, B.D., Erlichman, C., Gottardis, M., Karp, J.E., et al. (2009). Expression of insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor-1 receptor in human acute myelogenous leukemia: effect of the dual-receptor inhibitor BMS-536924 in vitro. *Cancer Res.* 69, 7635–7643.

Wander, S.A., Levis, M.J., and Fathi, A.T. (2014). The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. *Ther. Adv. Hematol.* 5, 65–77.

Wang, J., Kataoka, H., Suzuki, M., Sato, N., Nakamura, R., Tao, H., Maruyama, K., Isogaki, J., Kanaoka, S., Ihara, M., et al. (2005). Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal cancer. *Oncogene* 24, 5637–5647.

Wang, Z., Miura, N., Bonelli, A., Mole, P., Carlesso, N., Olson, D.P., and Scadden, D.T. (2002). Receptor tyrosine kinase, EphB4 (HTK), accelerates differentiation of select human hematopoietic cells. *Blood* 99, 2740–2747.

Weis, S.M., Lim, S.-T., Lutu-Fuga, K.M., Barnes, L.A., Chen, X.L., Göthert, J.R., Shen, T.-L., Guan, J.-L., Schlaepfer, D.D., and Cheresh, D.A. (2008). Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. *J. Cell Biol.* 181, 43–50.

Weissman, I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157–168.

Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P., 4th, Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., and Aster, J.C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269–271.

Weston, B.W., Hayden, M.A., Roberts, K.G., Bowyer, S., Hsu, J., Fedoriw, G., Rao, K.W., and Mullighan, C.G. (2013). Tyrosine kinase inhibitor therapy induces remission in a patient with

refractory EBF1-PDGFRB-positive acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, e413-416.

Wetzler, M., Dodge, R.K., Mrózek, K., Carroll, A.J., Tantravahi, R., Block, A.W., Pettenati, M.J., Le Beau, M.M., Frankel, S.R., Stewart, C.C., et al. (1999). Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the cancer and leukemia Group B experience. *Blood* **93**, 3983–3993.

Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T.S., Wright, G., Davis, R.E., Henrickson, S.E., Zhao, H., Ibbotson, R.E., Orchard, J.A., Davis, Z., et al. (2003). ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* **101**, 4944–4951.

Wittman, M., Carboni, J., Attar, R., Balasubramanian, B., Balimane, P., Brassil, P., Beaulieu, F., Chang, C., Clarke, W., Dell, J., et al. (2005). Discovery of a (1H-benzoimidazol-2-yl)-1H-pyridin-2-one (BMS-536924) inhibitor of insulin-like growth factor I receptor kinase with in vivo antitumor activity. *J. Med. Chem.* **48**, 5639–5643.

Wong, S., and Witte, O.N. (2004). The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 247–306.

Wood, J.M., Bold, G., Buchdunger, E., Cozens, R., Ferrari, S., Frei, J., Hofmann, F., Mestan, J., Mett, H., O'Reilly, T., et al. (2000). PTK787/ZK 222584, a Novel and Potent Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases, Impairs Vascular Endothelial Growth Factor-induced Responses and Tumor Growth after Oral Administration. *Cancer Res.* **60**, 2178–2189.

Xi, Y., Chen, M., Liu, X., Lu, Z., Ding, Y., and Li, D. (2014). CP-673451, a platelet-derived growth-factor receptor inhibitor, suppresses lung cancer cell proliferation and migration. *OncoTargets Ther.* **7**, 1215–1221.

Yamada, S., Nomura, T., Takano, K., Fujita, S., Miyake, M., and Miyake, J. (2008). Expression of a chimeric CSF1R-LTK mediates ligand-dependent neurite outgrowth. *Neuroreport* **19**, 1733–1738.

Yang, W.C., Ching, K.A., Tsoukas, C.D., and Berg, L.J. (2001). Tec kinase signaling in T cells is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and the Tec pleckstrin homology domain. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 387–395.

Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 443–478.

Yeatman, T.J. (2004). A renaissance for SRC. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 470–480.

Zhang, H., Peng, C., Hu, Y., Li, H., Sheng, Z., Chen, Y., Sullivan, C., Cerny, J., Hutchinson, L., Higgins, A., et al. (2012). The Blk pathway functions as a tumor suppressor in chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat. Genet.* **44**, 861–871.

Zhao, H., and Caflisch, A. (2013). Discovery of ZAP70 inhibitors by high-throughput docking into a conformation of its kinase domain generated by molecular dynamics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 5721–5726.

Zhao, G., Li, W.-Y., Chen, D., Henry, J.R., Li, H.-Y., Chen, Z., Zia-Ebrahimi, M., Bloem, L., Zhai, Y., Huss, K., et al. (2011). A novel, selective inhibitor of fibroblast growth factor receptors that shows a potent broad spectrum of antitumor activity in several tumor xenograft models. *Mol. Cancer Ther.* **10**, 2200–2210.

Ziegler, B.L., Valtieri, M., Porada, G.A., De Maria, R., Müller, R., Masella, B., Gabbianelli, M., Casella, I., Pelosi, E., Bock, T., et al. (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285, 1553–1558.

### 8.1.1 Internetquellen

[1]: [bloodlines.stemcells.com](http://bloodlines.stemcells.com)

(aufgerufen am 01.07.2016)

[2]: Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/), based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015.

(aufgerufen am 01.08.2015)

[3]: Hehn; Epidemiologie

<http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[4]: ATCC

<http://www.lgcstandards-atcc.org/support/faqs/1864a/Subpopulations%20in%20PCS-800-011%20and%20PCS-800-013.aspx?device=modal>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[5] NHLBI Exome Sequencing Project (ESP)

<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[6] Lonza „*Cell & Transfection Database*“

<http://bio.lonza.com/6.html>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[7] BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) von NCBI

[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)

(aufgerufen am 01.08.2015)

[8] NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

(aufgerufen am 01.08.2015)

[9] EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*)

<http://www.ebi.ac.uk/>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[10] ENSEMBL

<http://www.ensembl.org>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[11] *Oligonucleotide Properties Calculator*

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[12] Programm Primer 3

[http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)

(aufgerufen am 01.08.2015)

[13] ExPASy *translate-tool*

<http://web.expasy.org/translate/>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[14] *CpG Island Searcher*

<http://cpgislands.usc.edu/>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[15] *EMBOSS Cpgplot* von EMBL-EBI

[http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_cpgplot/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/)

(aufgerufen am 01.08.2015)

[16] *NEBcutter V2.0* von New England Biolabs

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[17] CLS Cell Lines Service GMBH

[www.cell-lines-service.de](http://www.cell-lines-service.de)

(aufgerufen am 01.08.2015)

[18] *American Type Culture Collection* (ATCC)

[http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo\\_country=de](http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=de)

(aufgerufen am 01.08.2015)

[19] Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

[www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)

(aufgerufen am 01.08.2015)

[20] GEO DataSets, database gene expression

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[21] BioGPS

<http://biogps.org/#goto=welcome>.

(aufgerufen am 01.08.2015)

[22] Leukemia Gene Atlas (LGA)

<http://www.leukemia-gene-atlas.org/LGAtlas/>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[23] Ronan T Sword, Andrew H Wei, Simon Durrant, Anjali S. Advani, Mark S Hertzberg, Ian D Lewis, Peter L. Greenberg, Jorge Cortes, Geoff T Yarranton, Jackie M. Walling and Jeffrey E. Lancet, KB004, a Novel Non-Fucosylated Humaneered® Antibody, Targeting EphA3, Is Active and Well Tolerated in a Phase I/II Study of Advanced Hematologic Malignancies

<https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper75316.html>

(aufgerufen am 01.08.2015)

[24] Fernanda Marconi Roversi, Fernando Vieira Pericole, Adriana da Silva Santos Duarte, Karla Priscila Ferro, Flávia Adolfo Corrocher, Bruna Palodetto, Ana Leda Longhini, Maurizio Botta, and Sara T Saad, M.D. Knockdown of HCK Reduces Cell Death and Erythroid Differentiation in Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells

<https://ash.confex.com/ash/2015/webprogram/Paper85835.html>

(aufgerufen am 11.11.2015)

[25] Combination Chemotherapy With or Without Lestaurtinib in Treating Younger Patients With Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00557193?term=flt3+all+mll&rank=1>

(aufgerufen am 01.07.2016)

[26] 3756 KB004, a Novel Non-Fucosylated Humanized® Antibody, Targeting EphA3, Is Active and Well Tolerated in a Phase I/II Study of Advanced Hematologic Malignancies.

Ronan T Swords, Andrew H Wei, Simon Durrant, Anjali S. Advani, Mark S Hertzberg, Ian D Lewis, Peter L. Greenberg, Jorge Cortes, Geoff T Yarranton, Jackie M. Walling and Jeffrey E. Lancet, MD11

<https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper75316.html>

(aufgerufen am 01.07.2016)

[27] A Phase III Randomized, Double-Blind Study of Induction (Daunorubicin/Cytarabine) and Consolidation (High-Dose Cytarabine) Chemotherapy + Midostaurin (PKC412) (IND #101261) or Placebo in Newly Diagnosed Patients < 60 Years of Age With FLT3 Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML)

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00651261?sect=X01256>

(aufgerufen am 01.02.2017)

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

### 8.2.1 Maßzahlen

°C	Grad celsius	g	Gramm
l	Liter	M	molar (Mol pro Liter)
min	Minute(n)	mg	Milligramm
ml	Milliliter	nm	Nanometer
rpm	<i>rounds per minute</i>	Sek	Sekunde(n)
Std	Stunde(n)	U	Einheit(en), engl.: <i>unit(s)</i>
µl	Mikroliter	µg	Mikrogramm
V	Volt		

### 8.2.2 Abkürzungen

Akt	<i>V-Akt Murine Thyoma Viral Oncogene Homologs</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AP1	<i>Activator Protein 1</i> ; ein Transkriptionsfaktor
AP-2 complex	Adaptorkomplex 2
AraC	Cytosinarabinosid
AS	Aminosäuren
ATCC	American Tissue Culture Collection
B2M	β2-Mikroglobulin
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BMSC	Stromazellen des Knochenmarks (engl.: <i>bone marrow stroma cells</i> )
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i> )
bzw	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i> )
CEL	chronische eosinophile Leukämie
CIP	Alkalische Phosphatase (engl.: <i>calf intestinale phosphatase</i> )
CLP	lymphatischen Progenitorzellen (engl.: <i>common lymphoid progenitors</i> )
CML	chronische myeloische Leukämie
CMP	myeloischen Progenitorzellen (engl.: <i>common myeloid progenitors</i> )
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CMML	chronische myelomonozytische Leukämie
CNV	Variationen der Kopienanzahl (engl.: <i>copy number variations</i> )
CR	komplette Remission (engl.: <i>complete remission</i> )
CRD	Cystein-reiche Domäne
CSF	koloniestimulierende Faktoren (engl.: <i>colony-stimulating factors</i> )
C-terminal	carboxy-terminal
Ct-Wert	Zyklusschwellenwert (engl.: <i>cycle threshold</i> )
CTD	C-terminale Domäne
DAG	Diacylglycerin
DEAE	Diethylaminoethanol
DMEM	Dulbecco's modified Eigel Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

## VERZEICHNISSE

DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF-Rezeptoren	epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren (engl.: <i>epidermal growth factor receptors</i> )
EPO	Erythropoetin
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinases
et al.	und andere, lat. at alii
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (engl.: <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FAP1	Familial Adenomatous Polyposis 1
FCS	fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i> )
FDA	federal drug administration
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktoren (engl.: <i>fibroblast growth factor</i> )
FL	fms related tyrosine kinase 3 (FLT3) ligand
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FRS2α	<i>FGFR substrat-2</i>
Gab1	<i>GRB2-associated Binding protein 1</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GIST	gastrointestinale Stromatumore
GOI	engl.: <i>gene of interest</i>
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSP	Gen-spezifischer Primer
GUSB	β-Glucuronidase
HCL-tree	hierarchical clustering tree
HDAC	Histondeacetylase
HK	Haushaltsgen (engl.: <i>house keeping gene</i> )
HM	hypermethyliert
HOX	Homöobox
HRM	engl.: <i>high resolution melt</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: <i>hourseradish peroxidase</i> )
HSC	hämatopoetischen Stammzellen (engl.: <i>hematopoetic stem cells</i> )
HSPGs	heparan sulfate proteoglycan
ICD	intrazelluläre Domäne
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factors
IKKβ	<i>Inhibitor of NFκB Kinase β subunit</i>
IL	Interleukin
IM	intermediär methyliert
IP3	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRS1	<i>Insulin Receptor Substrate 1</i>
ITD	interne tandem Duplikation
JM	juxtamembran
Kap1	<i>Krab-associated Protein 1</i>



kb	Kilobasenpaare
KM	Knochenmark
LAT	Linker for Activation of T cells
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDI-PCR	Long Distance Inverse PCR
LSC	leukämische Stammzelle (engl.: <i>leukemic stem cell</i> )
LT-HSC	<i>long term hematopoietic stem cells</i>
m/w	männlich/weiblich
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MCS	Multiple Cloning Site
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2 homolog</i>
MeOH	Methanol
MLL	<i>Mixed Lineage Leukemia protein</i>
MT2A	<i>lysine (K)-specific Methyltransferase 2A</i>
MPP	multipotente Vorläuferzellen
MPS	myeloproliferatives Syndrom
MRD	minimale Resterkrankung (engl.: <i>minimal residual disease</i> )
mRNA	messenger RNA
Myc	<i>V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa-B</i>
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor (engl.: <i>nerve growth factor</i> )
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
NP	Normalperson
NRTK	zytoplasmatischen Tyrosinkinasen („ <i>non receptor</i> “ Tyrosinkinasen)
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (engl.: <i>non-small cell lung cancer</i> )
NT3	Neutrophin 3
N-terminal	amino-terminal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pc3	<i>pcDNA3.1</i> -Vektor
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
pH	negative dekadischer Logarithmus der [H <sup>+</sup> ]-Konzentration
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PLCy	Phospholipase Cy
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
PKC	Proteinkinase C
PTB	Phosphotyrosinbindungsstellen
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PtdInsP3	Phosphatidylinositoltrisphosphate
PTP	Protein-Tyrosinphosphatasen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative RT-PCR
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RCC	Nierenzellkarzinom (engl.: <i>renal cell carcinoma</i> )

## VERZEICHNISSE

RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-SEQ	RNA-Sequenzierung
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
SCF	Stammzellfaktor (engl.: <i>stem cell factor</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEER-Register	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SFK	SRC-Familie von Kinasen
SH2/SH3-Domänen	SRC-homologe 2/3 Domänen
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismen (engl.: <i>Single Nucleotid Polymorphism</i> )
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
ST-HSC	<i>short term hematopoietic stem cells</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl.: <i>T-cell receptor</i> )
TGFβ	Transforming growth factor beta
TK	Tyrosinkinasen
TKD	Tyrosinkinase-Domäne
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UM	unmethyliert
UTR	untranslatierter Bereich (engl.: <i>untranslated region</i> )
UV	Ultraviolett
VEGF	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (engl.: <i>vascular endothelial growth factors</i> )
VEGFR	vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptoren (engl.: <i>vascular endothelial growth-factor receptors</i> )
WHO	World Health Organization
WST	<i>water soluble tetrazolium</i>
WT	Wildtyp
YAP	Yes-associated protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

### 8.2.3 Namen der Tyrosinkinassen

**Tabelle 8-1: Tyrosinkinase-Abkürzungen und alternative verwendete Namen**

Tyrosinkinase Symbol	Tyrosinkinase Name	alternative Namen
AATK	APOPTOSIS-ASSOCIATED TYROSINE KINASE	AATYK
ABL1	ABELSON MURINE LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 1	ABL
ABL2	ABELSON MURINE LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 2	ARG
ALK	ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE	-
AXL	vom griechischen „ <i>anexelekto</i> “ = unkontrolliert	-
BLK	TYROSINE KINASE, B-LYMPHOCYTE SPECIFIC	-
BMX	BONE MARROW KINASE, X-LINKED	Etk
BTK	BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA TYROSINE KINASE	ATK, BPK
CSF1R	COLONY-STIMULATING FACTOR 1 RECEPTOR	MCSFR; FMS; CD115
CSK	CYTOPLASMIC TYROSINE KINASE	c-SRC TYROSINE KINASE
DDR1	DISCOIDIN DOMAIN RECEPTOR FAMILY, MEMBER 1	NEP; EDDR1; NTRK4; TRKE; PTK3; CAK; RTK6
DDR2	DISCOIDIN DOMAIN RECEPTOR FAMILY, MEMBER 2	NTRKR3; TKT
EPHA1	EPHRIN RECEPTOR A1	EPH; EPHT
EPHA2	EPHRIN RECEPTOR A2	ECK
EPHA3	EPHRIN RECEPTOR A3	HEK; ETK1; HEK4; TYRO4
EPHA4	EPHRIN RECEPTOR A4	HEK8; SEK
EPHA5	EPHRIN RECEPTOR A5	HEK7; EHK1; TYRO4
EPHA6	EPHRIN RECEPTOR A6	HEK12; EHK2
EPHA7	EPHRIN RECEPTOR A7	HEK11
EPHA8	EPHRIN RECEPTOR A8	HEK 3; EEK
EPHB1	EPHRIN RECEPTOR B1	HEK6; NET; EPHT2; ELK
EPHB2	EPHRIN RECEPTOR B2	HEK5; ERK; DRT; EPHT3
EPHB3	EPHRIN RECEPTOR B3	HEK2; ETK2; TYRO6
EPHB4	EPHRIN RECEPTOR B4	HTK; MYK1; TYRO11
EPHB6	EPHRIN RECEPTOR B6	HEP
ERBB1	V-ERB-B2 AVIAN ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 1	EGFR; HER1; SA7
ERBB2	V-ERB-B2 AVIAN ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 2	HER2; NGL; TKR1
ERBB3	V-ERB-B2 AVIAN ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 3	HER3
ERBB4	V-ERB-B2 AVIAN ERYTHROBLASTIC LEUKEMIA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 4	HER4
FER	FPS/FES-RELATED TYROSINE KINASE	TYK3
FES	V-FES FELINE SARCOMA VIRAL/V-FPS FUJINAMI AVIAN SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG	FPS
FGFR1	FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 1	FLT2; FLG
FGFR2	FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 2	FGF RECEPTOR; TK14
FGFR3	FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 3	-
FGFR4	FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 4	TKF
FGR	GARDNER-RASHEED FELINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG	-
FLT1	FMS-RELATED TYROSINE KINASE 1	VEGFR1; FLT
FLT3	FMS-RELATED TYROSINE KINASE 3	STK1; FLK2

## VERZEICHNISSE

FLT4	FMS-RELATED TYROSINE KINASE 4	VEGFR3
FRK	FYN-RELATED KINAS	RAK, GTK
FYN	FYN ONCOGENE RELATED TO SRC, FGR, YES	SLK; SYN
HCK	HEMOPOIETIC CELL KINASE	-
IGF1R	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I RECEPTOR	-
INSR	INSULIN RECEPTOR	-
INSRR	INSULIN RECEPTOR-RELATED RECEPTOR	IRR
ITK	IL2-INDUCIBLE T-CELL KINASE	EMT; TSK
JAK1	JANUS KINASE 1	-
JAK2	JANUS KINASE 2	-
JAK3	JANUS KINASE 3	JAKL
KDR	KINASE INSERT DOMAIN RECEPTOR	VEGFR2; FLK1
KIT	V-KIT HARDY-ZUCKERMAN 4 FELINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG	SCFR
LCK	LYMPHOCYTE-SPECIFIC PROTEIN-TYROSINE KINASE	-
LTK	LEUKOCYTE TYROSINE KINASE	TYK1
LYN	V-YES-1 YAMAGUCHI SARCOMA VIRAL RELATED ONCOGENE HOMOLOG	-
MATK	MEGAKARYOCTE-ASSOCIATED TYROSINE KINASE	HYL; CTK
MERTK	MER TYROSINE KINASE PROTOONCOGENE	-
MET	MET PROTOONCOGENE	HGFR
MST1R	MACROPHAGE STIMULATING 1 RECEPTOR	RON; MSP Receptor
MUSK	MUSCLE, SKELETAL, RECEPTOR TYROSINE KINASE	NSK2
NTRK1	NEUROTROPHIC TYROSINE KINASE, RECEPTOR, TYPE 1	TRKA
NTRK2	NEUROTROPHIC TYROSINE KINASE, RECEPTOR, TYPE 2	TRKB
NTRK3	NEUROTROPHIC TYROSINE KINASE, RECEPTOR, TYPE 1	TRKC
PDGFRA	PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR, ALPHA	PDGFR2
PDGFRB	PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR, BETA	PDGFR1
PTK2	PROTEIN-TYROSINE KINASE, CYTOPLASMIC	FAK
PTK2B	PROTEIN-TYROSINE KINASE 2, BETA	PYK2, FAK2; CAKB
PTK6	PROTEIN-TYROSINE KINASE 6	BRK
PTK7	PROTEIN-TYROSINE KINASE PTK7	CCK4
RET	REARRANGED DURING TRANSFECTION PROTOONCOGENE	
ROR1	RECEPTOR TYROSINE KINASE-LIKE ORPHAN RECEPTOR 1	NTRKR1
ROR2	RECEPTOR TYROSINE KINASE-LIKE ORPHAN RECEPTOR 2	NTRKR2
ROS1	V-ROS AVIAN UR2 SARCOMA VIRUS ONCOGENE HOMOLOG 1	MCF3
RYK	RYK RECEPTOR-LIKE TYROSINE KINASE	-
SRC	V-SRC AVIAN SARCOMA (SCHMIDT-RUPPIN A-2) VIRAL ONCOGENE	ASV
SRMS	SRC-RELATED KINASE LACKING C-TERMINAL REGULATORY TYROSINE AND N-TERMINAL MYRISTYLATION SITES	-
SYK	PROTEIN-TYROSINE KINASE SYK	-
TEC	TEC PROTEIN TYROSINE KINASE	-
TEK	TEK TYROSINE KINASE, ENDOTHELIAL	TIE2
TIE	TYROSINE KINASE WITH IMMUNOGLOBULIN AND EGF FACTOR HOMOLOGY DOMAINS 1	TIE1
TNK1	TYROSINE KINASE, NONRECEPTOR, 1	-
TNK2	TYROSINE KINASE, NONRECEPTOR, 2	ACK1

TXK	PROTEIN TYROSINE KINASE TXK	RLK
TYK2	TYROSINE KINASE 2	-
TYRO3	TYRO3 PROTEIN TYROSINE KINASE	PTK3
YES1	V-YES-1 YAMAGUCHI SARCOMA VIRAL ONCOGENE	-
ZAP70	ZETA-CHAIN-ASSOCIATED PROTEIN KINASE	SRK

### 8.3 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1-1: Klassisches Modell der Hämatopoese.....	2
Abbildung 1-2: Mechanismen der Leukämieentstehung.....	4
Abbildung 1-3: Entstehung leukämischer Stammzellen.....	5
Abbildung 1-4: Häufigkeiten der verschiedenen ALL-Subgruppen .....	7
Abbildung 1-5: Zytogenetische Veränderungen in adulter B-ALL (Pui et al., 2004) .....	8
Abbildung 1-6: Zytogenetische Veränderungen in adulter T-ALL (Lafage-Pochitaloff et al., 2014; Marks et al., 2009) .....	10
Abbildung 1-7: Autoinhibition und Aktivierung von Tyrosinkinasen.....	14
Abbildung 1-8: Beispiel für RTK-Signalkaskaden anhand des FGF-Rezeptors .....	16
Abbildung 1-9: Tyrosinkinase-Inhibition.....	20
Abbildung 3-1: Hoch exprimierte Tyrosinkinasen in akuter B- und T-lymphatischer Leukämie (mittlere $2^{-DDCt}$ -Wert $\geq 5 \times 10^{-2}$ ).....	33
Abbildung 3-2: Verstärkt exprimierte Tyrosinkinasen in akuter B- und T-lymphatischer Leukämie (mittlerer $2^{-DDCt}$ -Wert $\geq 4$ , bei hohem Expressionsniveau $2^{-DDCt} \geq 2$ ).....	34
Abbildung 3-3: Verringert exprimierte Tyrosinkinasen in akuter B- und T-lymphatischer Leukämie (mittlerer $2^{-DDCt}$ -Wert $\leq 0,2$ ) .....	35
Abbildung 3-4: FLT3-Expression von ALL-Proben mit Expression myeloischer Antigene ....	36
Abbildung 3-5: Verstärkt exprimierte Tyrosinkinasen in akuter B-lymphatischer Leukämie (mittlerer $2^{-DDCt}$ -Wert $\geq 4$ , bei hohem Expressionsniveau $2^{-DDCt} \geq 2$ ).....	37
Abbildung 3-6: Verringert exprimierte Tyrosinkinasen in akuter B-lymphatischer Leukämie (mittlerer $2^{-DDCt}$ -Wert $\leq 0,2$ ).....	38
Abbildung 3-7: Tyrosinkinasen mit variierender Expression in akuter B-lymphatischer Leukämie .....	39
Abbildung 3-8: Verstärkt exprimierte Tyrosinkinasen in akuter T-lymphatischer Leukämie (mittlere $2^{-DDCt}$ -Wert $\geq 4$ , bei hohem Expressionsniveau $2^{-DDCt} \geq 2$ ).....	42
Abbildung 3-9: Verringert exprimierte Tyrosinkinasen in akuter T-lymphatischer Leukämie (mittlere $2^{-DDCt}$ -Wert $\leq 0,2$ ) .....	42
Abbildung 3-10: Tyrosinkinasen mit variierender Expression in akuter T-lymphatischer Leukämie .....	43
Abbildung 3-11: Unterschiedlich exprimierte Tyrosinkinasen in CD3+, CD19+ und CD34+ hämatopoetischen Zellen.....	46

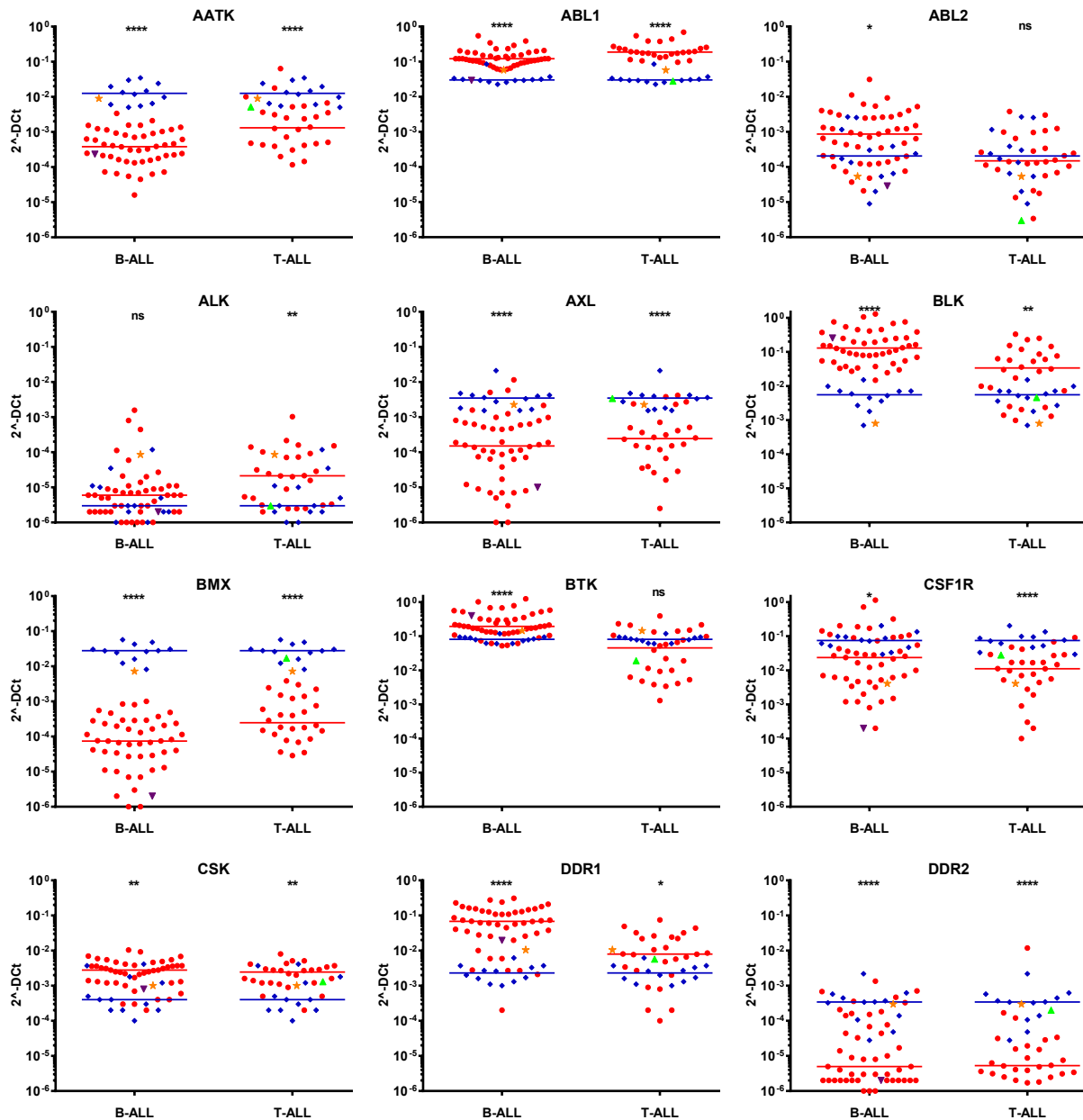
Abbildung 3-12: Tyrosinkinase-Expression in B-ALL: HCL-tree und Heatmap der DCt-Werte von B-Linien ALL Proben und Normalpersonen .....	48
Abbildung 3-13: Expressionsveränderungen in B-ALL: HCL-tree und Heatmap der DDcT-Werte der B-Linien ALL Proben.....	49
Abbildung 3-14: Tyrosinkinase-Expression in T-ALL: HCL-tree und Heatmap der DCt-Werte von T-Linien ALL Proben und Normalpersonen .....	50
Abbildung 3-15: Expressionsveränderungen in T-ALL: HCL-tree und Heatmap der DDcT-Werte der T-Linien ALL Proben .....	51
Abbildung 3-16: Methylierungsanalyse der Promotorregionen von <i>ABL1</i> , <i>DDR1</i> , <i>EPHA7</i> , <i>FGFR1</i> , <i>FLT1</i> , <i>FLT3</i> , <i>FLT4</i> , <i>HCK</i> , <i>KDR</i> , <i>KIT</i> und <i>PTK7</i> . ....	56
Abbildung 3-17: Sorafenibbehandlung IL2-unabhängiger, <i>FLT4</i> -überexprimierender BaF3-Zellen und IL2-abhängiger BaF3-Zellen .....	59
Abbildung 3-18: Transiente <i>FLT4</i> -Transfektion von Molt 4- und Nalm 6-Zellen .....	59
Abbildung 3-19: Wachstum von <i>FLT4</i> oder <i>pcDNA3.1empty</i> transient überexprimierenden Nalm 6- und Molt 4-Zellen ohne/mit Sorafenib-Behandlung .....	60
Abbildung 3-20: Wachstum von <i>FLT4</i> oder <i>pcDNA3.1empty</i> stabil überexprimierenden Nalm 6-Zellen ohne/mit Sunitinib-Behandlung .....	61
Abbildung 3-21: Wachstum von <i>ERBB4 JmA-CYT1</i> , <i>ERBB4 JmB-CYT1</i> oder <i>pcDNA3.1empty</i> transfizierten Jurkat-Zellen ohne/mit Lapatinib-Behandlung .....	62
Abbildung 3-22: Wachstum von <i>ERBB4 JmA-CYT1</i> , <i>ERBB4 JmB-CYT1</i> oder <i>pcDNA3.1empty</i> transfizierten Molt 4-Zellen ohne/mit Lapatinib-Behandlung .....	63
Abbildung 3-23: Wachstum von <i>EPHA7-FL</i> , <i>EPHA7-S</i> oder <i>pcDNA3.1empty</i> transfizierten Jurkat-Zellen ohne/mit Dasatinib-Behandlung .....	65
Abbildung 3-24: Wachstum von <i>EPHA7-FL</i> , <i>EPHA7-S</i> oder <i>pcDNA3.1empty</i> transfizierten Nalm 6-Zellen ohne/mit Dasatinib-Behandlung .....	66
Abbildung 3-25: Wachstum von <i>EPHA7-FL</i> , <i>EPHA7-S</i> oder <i>pcDNA3.1empty</i> transfizierten Jurkat-Zellen ohne/mit Linifanib-Behandlung .....	67
Abbildung 3-26: Wachstum von <i>EPHA7-FL</i> , <i>EPHA7-S</i> oder <i>pcDNA3.1empty</i> transfizierten Nalm 6-Zellen ohne/mit Linifanib-Behandlung .....	68
Abbildung 3-27: FLT4 C2670G Sequenzpolymorphismus (rs448012):.....	70
Abbildung 3-28: FLT4 C2670G Sequenzpolymorphismus (rs448012):.....	70
Abbildung 3-29: FLT4 G3971T Sequenzpolymorphismus (rs307821): .....	71
Abbildung 3-30: Schmelzkurvenanalyse FLT4 G3971T Sequenzpolymorphismus .....	71
Abbildung 3-31: Verteilung des FLT4 G3971T Sequenzpolymorphismus (rs307821) in B-ALL, T-ALL und Normalpersonen .....	71
Abbildung 3-32: a: cDNA-Sequenz mit kryptischem Exon (grün).....	72
Abbildung 3-33: ROR1 C1553T Sequenzpolymorphismus (rs7527017):.....	72

Abbildung 3-34: Schmelzkurvenanalyse des ROR1 C1553T Sequenzpolymorphismus.....	73
Abbildung 3-35: Verteilung des ROR1 C1553T Sequenzpolymorphismus (rs7527017) in ALL-Patienten und Normalpersonen .....	73
Abbildung 3-36: FLT3-ITD Analyse der genomischen DNA von B-ALL-Proben .....	74
Abbildung 3-37: PCR ERBB4-Spleißvarianten A: ERBB4-Spleißvarianten CYT1 (201 bp) und CYT2 (153 bp) B: ERBB4-Spleißvarianten JmA (143 bp) und JmB (105 bp) .....	74
Abbildung 3-38: PCR EPHA7-Spleißvarianten: EPHA7-FL (155 bp) und EPHA7-S (116 bp)	75
Abbildung 3-39: PCR NTRK3-Spleißvarianten: <i>NTRK3</i> -Volllänge Isoform (1000 bp) und inaktive <i>NTRK3</i> -Isoform (499 bp) von T-ALL-Patienten .....	75
Abbildung 3-40: PCR <i>TYK2</i> -Spleißvarianten: <i>TYK2</i> Volllänge-Isoform (840 bp) und <i>TYK2</i> -E971fsX67 (720 bp) von ALL- und Kontrollproben .....	76
Abbildung 3-41: PCR <i>LCK</i> -Spleißvarianten: <i>LCK</i> -Volllänge Isoform (950 bp) und <i>LCKΔ7</i> -Isoform (800 bp) in ALL- und Kontrollproben .....	77
Abbildung 3-42: <i>NUP214-ABL1</i> PCR in <i>ABL1</i> überexprimierenden ALL-Proben.....	77
Abbildung 3-43: <i>PDGFRB</i> LDI-PCR in <i>PDGFRB</i> überexprimierenden ALL-Proben .....	78
Abbildung 3-44: <i>FGFR1</i> LDI-PCR in <i>FGFR1</i> überexprimierenden T-ALL Proben .....	78
Abbildung 4-1: Übersicht der DDCT-Werte differentiell exprimierter Tyrosinkinase-Gene von Patienten mit B-Linien ALL, T-Linien ALL und Normalpersonen.....	119
Abbildung 6-1   DNA-Größenstandards HyperLadder™ 1 kb, HyperLadder™ 50 bp und HyperLadder™ 25 bp (Quelle: Bioline, Luckenwalde) .....	133
Abbildung 6-2: Schema einer LDI-PCR.....	136
Abbildung 6-3: <i>Custom TaqMan® Array Card</i> .....	141
Abbildung 6-4 Schematischer Versuchsaufbau des „ <i>EpiTect® Methyl qPCR Arrays</i> “ Abbildung modifiziert nach <i>EpiTect® Methyl qPCR Assay Handbook</i> , Qiagen, Hilden. ....	144
Abbildung 6-5: Proteingrößenstandard, PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Quelle: Fermentas) .....	152
Abbildung 6-6: Schematischer Aufbau eines Semidry-Blots.....	153
Abbildung 6-7: Spaltung des Tetrazoliumsalzes zu Formazan (Quelle: Roche, Mannheim)	161
Abbildung 9-1: Expressionsanalyse von Tyrosinkinasen in akuter lymphatischer Leukämie .....	209

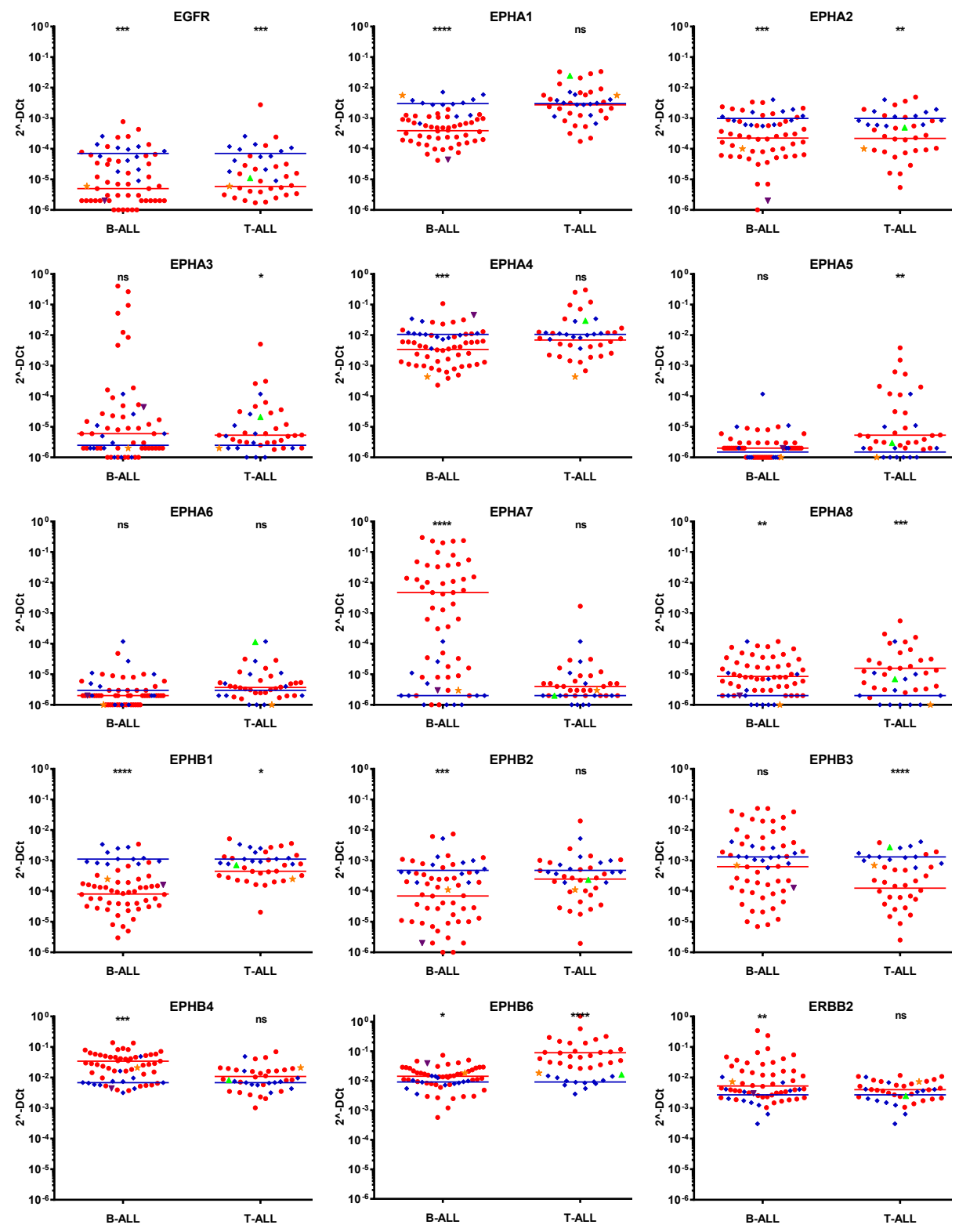
## 9 ANHANG

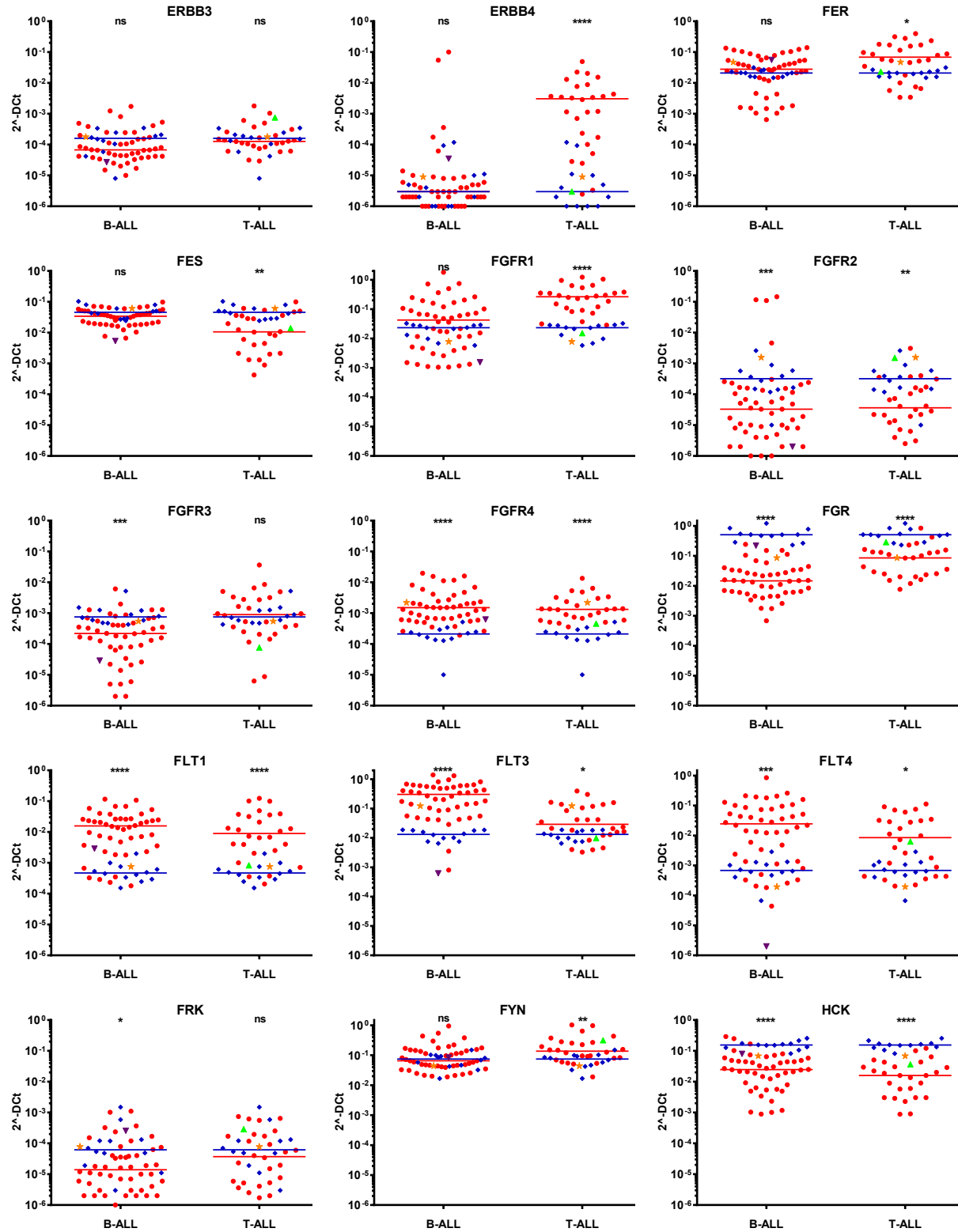
### 9.1 Ergebnisse der Expressionsanalyse des Tyrosin-Kinoms A-Z

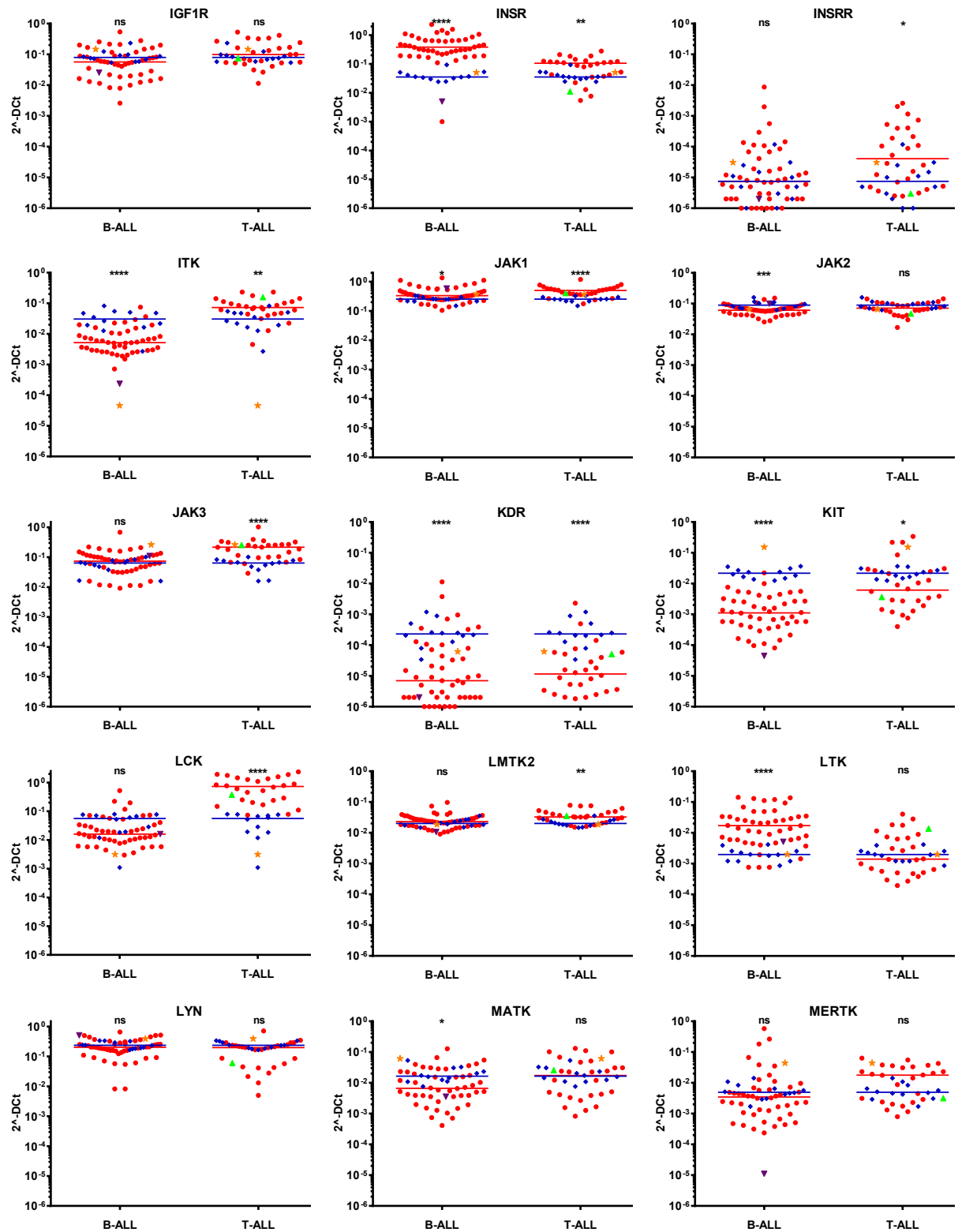
● Patientenproben ◆ Kontrollen ★ CD34+ ▼ CD19+ ▲ CD3+

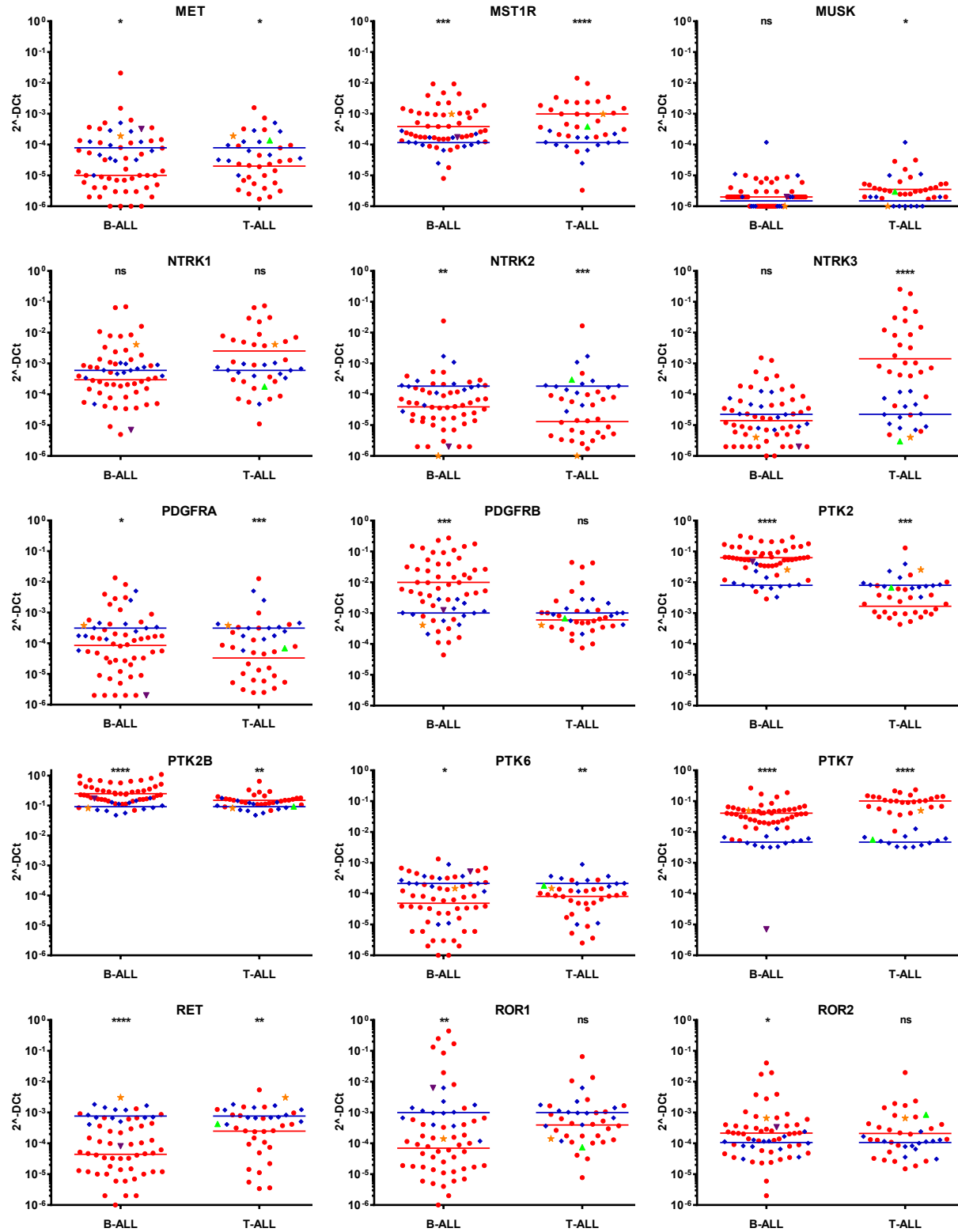


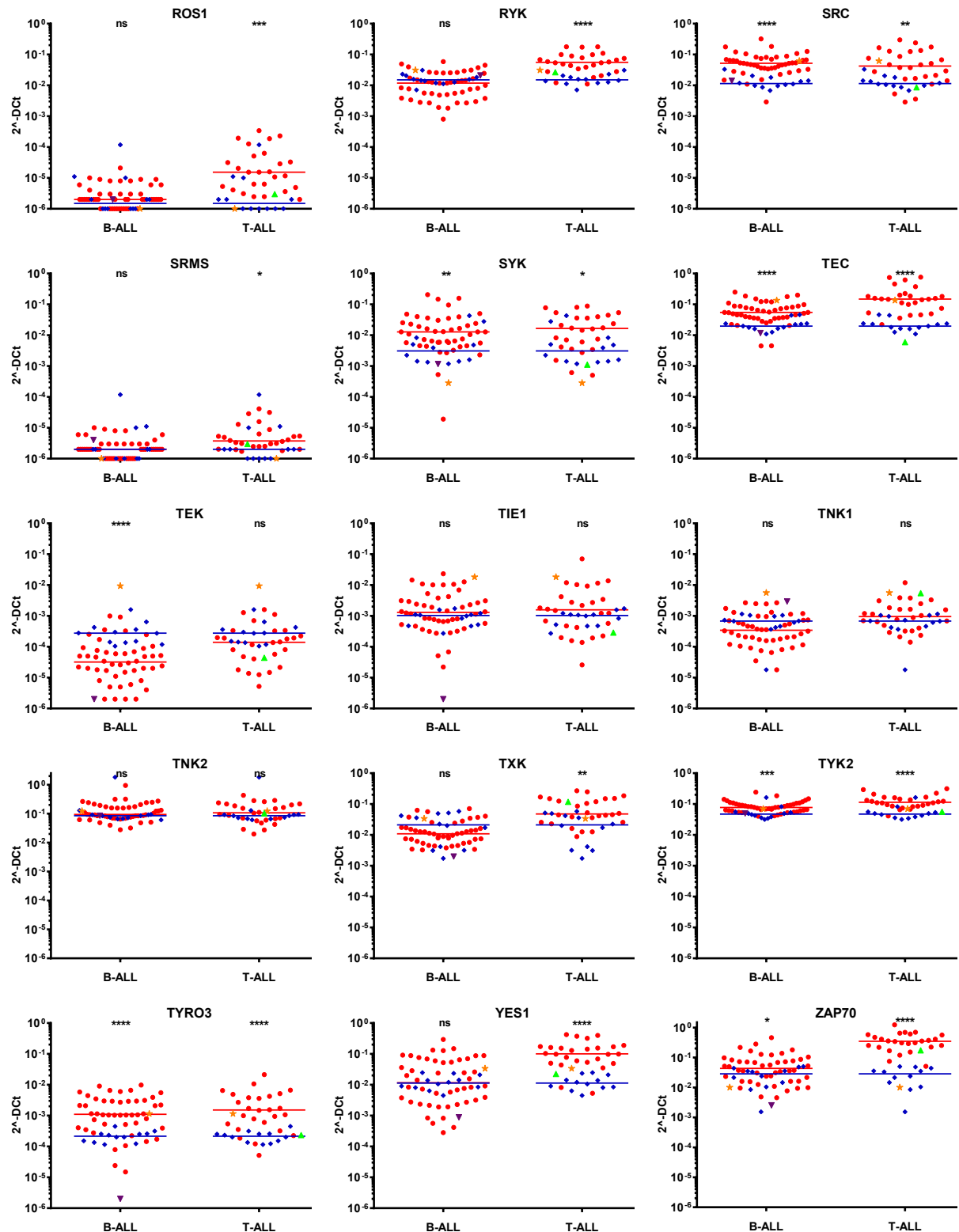












**Abbildung 9-1: Expressionsanalyse von Tyrosinkinasen in akuter lymphatischer Leukämie**

Die Analyse der Expression erfolgte mittels der „*TaqMan® Array Card*“ (Applied Biosystems, Darmstadt) entsprechend der Herstellerangaben. Dargestellt sind die normalisierten  $2^{-DCT}$ -Werte von B-ALL oder T-ALL Patientenproben (rot) und die der Normalpersonen (blau). Des Weiteren sind die  $2^{-DCT}$ -Werte für CD19+, CD3+ und CD34+ Zellen dargestellt. Dabei entspricht der Expressionsunterschied dem Quotientenwert  $2^{-DCT} = 2^{-DCT} \text{ ALL} / 2^{-DCT} \text{ NP}$ . Die Signifikanz ist wie folgt gekennzeichnet: ns: nicht signifikant

\*

$p < 0,05$

\*\*

$p < 0,01$

\*\*\*

$p < 0,001$

\*\*\*\*

$p < 0,0001$